



TITLE:

付着依存性動物細胞培養による生理活性物質の生産に関する研究(Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

雄賀多, 政昭

CITATION:

雄賀多, 政昭. 付着依存性動物細胞培養による生理活性物質の生産に関する研究. 京都大学, 1994, 博士(工学)

ISSUE DATE:

1994-09-24

URL:

<https://doi.org/10.11501/3079263>

RIGHT:

付着依存性動物細胞培養
による生理活性物質の
生産に関する研究

1994年

雄賀多 政昭

目 次

| | |
|---|----|
| 第 1 章 序論 | 1 |
| 1. 1 はじめに | 1 |
| 1. 2 動物細胞培養を利用した有用物質生産に関する既往の研究 | 2 |
| 1. 2. 1 遺伝子工学、細胞工学分野における既往の研究 | 2 |
| 1. 2. 2 付着依存性動物細胞の培養工学的諸問題に関する既往の研究 | 3 |
| 1. 2. 3 工業的生産のための培養形式に関する既往の研究 | 6 |
| 1. 2. 4 トロンボモジュリンに関する既往の研究 | 7 |
| 1. 3 本研究の目的と内容 | 8 |
| 1 章の記号表 | 10 |

第 1 編 付着依存性動物細胞を用いた生理活性物質 生産法の開発

| | |
|---|----|
| 第 2 章 付着依存性動物細胞の基礎的な培養特性 | 12 |
| 2. 1 緒言 | 12 |
| 2. 2 実験材料と実験方法 | 14 |
| 2. 3 実験結果と考察 | 16 |
| 2. 3. 1 細胞増殖速度と生理活性物質生産速度に及ぼす培地中グルコー ス濃度と血清濃度の影響 | 16 |
| 2. 3. 2 生理活性物質生産特性に対する無血清培地の検討 | 20 |
| 2. 3. 3 マイクロキャリアの選定とその濃度による細胞増殖特性 .. | 22 |
| 2. 4 結言 | 26 |
| 2 章の記号表 | 27 |

| | |
|--|----|
| 第 3 章 ミニジャーファーマンターを用いた繰返し回分マイクロキャ リア培養系における生理活性物質の高生産培養 | 28 |
|--|----|

| | | |
|---------|-----------------------------|----|
| 3. 1 | 緒言 | 28 |
| 3. 2 | 実験材料と実験方法 | 30 |
| 3. 3 | 実験結果と考察 | 33 |
| 3. 3. 1 | 繰返し回分マイクロキャリア培養系における酸素律速の影響 | 33 |
| 3. 3. 2 | 新鮮培地中のグルコース濃度と培養液繰返し回収間隔の影響 | 35 |
| 3. 3. 3 | 血清含有培地による培養初期の細胞増殖期間の検討 | 37 |
| 3. 3. 4 | 生理活性物質（トロンボモジュリン）の高生産培養 | 39 |
| 3. 4 | 結言 | 42 |
| 3 章 | の記号表 | 43 |
| 第 4 章 | 糖鎖修飾型生理活性物質の選択的高生産培養法 | 44 |
| 4. 1 | 緒言 | 44 |
| 4. 2 | 実験材料と実験方法 | 46 |
| 4. 3 | 実験結果と考察 | 48 |
| 4. 3. 1 | 糖鎖修飾型生理活性物質生産に及ぼす溶存酸素の影響 | 48 |
| 4. 3. 2 | 糖鎖修飾型生理活性物質の高生産培養法 | 51 |
| 4. 4 | 結言 | 55 |
| 4 章 | の記号表 | 56 |

第 2 編 生物反応速度を利用した培養状態推定法の開発

| | | |
|---------|------------------------------------|----|
| 第 5 章 | 繰返し回分培養系における細胞密度及び生理活性物質生産速度推定法の開発 | 58 |
| 5. 1 | 緒言 | 58 |
| 5. 2 | 実験材料と実験方法 | 60 |
| 5. 3 | 実験結果と考察 | 62 |
| 5. 3. 1 | 生物反応速度のモデリング | 62 |
| 5. 3. 2 | 動物細胞密度と生理活性物質生産速度推定のアルゴリズム | 67 |
| 5. 3. 3 | 繰返し回分培養系における培養状態量推定法の確立 | 69 |

| | | |
|------|------|----|
| 5. 4 | 結言 | 73 |
| 5 章 | の記号表 | 74 |

第 6 章 付着依存性動物細胞を用いた連続培養系の特性と培養状態推定法の応用

| | | |
|---------|------------------------|----|
| 6. 1 | 緒言 | 75 |
| 6. 2 | 実験材料と実験方法 | 76 |
| 6. 3 | 実験結果と考察 | 78 |
| 6. 3. 1 | 動物細胞連続培養系の特性 | 78 |
| 6. 3. 2 | 連続培養系への推定法の適用とモデル式の検証 | 81 |
| 6. 3. 3 | パラメータ同定による連続培養系の培養特性解析 | 85 |
| 6. 4 | 結言 | 89 |
| 6 章 | の記号表 | 90 |

第 7 章 総括

| | | |
|------|--------|----|
| 7. 1 | 本論文の要約 | 91 |
| 7. 2 | 今後の展望 | 94 |

引用文献

発表論文リスト

謝辞

第1章 序論

1. 1 はじめに

動物細胞培養に関する研究分野は、遺伝子を人為的に操作する遺伝子工学のレベルから、その遺伝子のホストとしての細胞の種類や特性を研究する細胞工学、細胞の選択に始まり培養スケール、培養方法やバイオリアクター、培地やマイクロキャリア等について主に生産性を重視して研究する培養工学、培養によって得られた材料から目的とする物質を純粋な形で抽出することを目的とする分離工学、発現された物質の組成や配列を分析手法によって同定する構造解析技術、などから構成される。これらのさまざまな分野が一連の流れの中で融合し協力し合うことによって”生産”という一つの目的が達成される。

これらの技術を”生物に由来する医薬品の創製”という観点から眺めると、さらに大きな研究領域の中の一部となる。医薬品を開発するためは、目的とする物質を探索することから始まり、薬理的な有効性や毒性の評価を行う前臨床試験段階の次に、人体における医薬品としての有効性や安全性の評価、製剤化研究等の臨床試験段階を経る。それと並行して上記で述べたように生産技術面から遺伝子工学－細胞工学－培養工学－分離工学－構造解析技術という研究が行われる。そして、これらの研究に基づいて製造プロセスレベルまで高度化、大規模化する製造技術、製剤化プロセス技術の段階へと進む。

本研究では、生体内で生理活性を持つヒト由来タンパク質であるトロンボモジュリンの生産プロセスを取り扱った。生理活性物質であるトロンボモジュリンは、血管内皮細胞の細胞膜上に発現している膜結合タンパク質であり、血液凝固系を調節する重要な役割を演じている。そのトロンボモジュリンの遺伝子を細胞内に導入して、形質転換を行った付着依存性Chinese hamster ovary (CHO-K1)細胞の培養特性やトロンボモジュリンの生産特性について、化学工学的手法を用いて生物反応速度論的解析を行うことにより、工業的製造プロセスを指向した基礎技術研究と生産技術の開発を行った。

1. 2 動物細胞培養を利用した有用物質生産に関する既往の研究

動物細胞培養に関連して、遺伝子工学や細胞培養工学等さまざまな領域で、いろいろな分野の研究者によって研究や技術開発が進められている。本論文に関連する研究を、以下に示す4つの観点から概説することにする。

1. 2. 1 遺伝子工学、細胞工学分野における既往の研究

遺伝子工学技術によって生理学的に活性を持つタンパク質の遺伝子を抽出し、増殖性やタンパク質の発現性に富んだ外部細胞に導入する方法が、さまざまな分野で多用されるようになった。大腸菌や酵母を代表とする微生物を宿主とする場合と、動・植物細胞を宿主とする場合に大別される。ヒト等の高等生物由来のタンパク質にはアミノ酸の配列に加え、側鎖として糖鎖が付加しており、生物学的活性において重要な機能を果たしている場合がある。大腸菌を宿主として利用する場合は側鎖を付加する機能を持たないため、ヒト由来のタンパク質を発現させるための宿主としては必ずしも適しているとは言えない。従って、糖鎖の存在が生物学的活性において重要な機能を果たしている場合、それを医薬品として開発する際には、主に動物由来の細胞が宿主として利用される。最近では、昆虫由来の細胞、或は昆虫そのものを宿主として利用する方法も脚光を浴びている。インターフェロン¹⁾やガン遺伝子産物²⁾、肝炎ウイルス(Hepatitis virus)タンパク質³⁾等が発現されている例があり、発現されたタンパク質の性状についても研究報告されている。

動物細胞には単独で浮遊しながら生存し増殖する浮遊細胞と、生存するためには付着するための担体を必要とする付着依存性細胞、及びどちらの形態も取り得る細胞の3つのタイプに類別される。3つ目のタイプには、浮遊した場合と付着した場合で性質や性状が異なる場合もある。付着依存性細胞としてはCHO細胞やマウス由来のL-細胞、C-127細胞があり、浮遊細胞にはハイブリドーマ細胞等が代表例である。CHO細胞については浮遊培養も可能だが、一般的には付着依存性細胞に分類される。本研究でも用いたCHO細胞は特に研究例が数多く、Urlaubらによるdhfr(dihydrofolate reductase)遺伝子欠損株の発見に端を発している⁴⁾。Kaufmanらにより、dhfr遺伝子欠損株にdhfr遺伝子と目的タンパク質の遺伝子を同時に導入する遺伝子増幅法が開発され⁵⁾、McCormickらによって、目的タンパク質の生産量を飛躍的に増大する方法が確立された^{6~7)}。その結果、CHO細胞を用いると、目的物質の高生産が期待できるため多用されるようになった。現在までにこの株を用いて、インターフェロン、インターロイキン-4(IL-4)、EDF(erythroid differentiation factor)等、さまざまなタンパク質が発現され成功をおさめている^{8~12)}。

CHO細胞のもう1つの特徴は、発現されたタンパク質に付加する糖鎖の構造にある。タンパク質によってはただ糖鎖が付加していればよいというのではなく、その構造によって活性に差が生じる場合がある。また、このようなタンパク質を医薬品として開発する場合は、できるだけ天然型に近いほうが好ましい。本研究で取り上げた生理活性物質のトロンボモジュリンも糖鎖が付加しており、その構造が活性に関与している可能性がある。CHO細胞によって作られるタンパク質に付加する糖鎖構造は、ヒト型に近いというデータもあるため、医薬品開発などにもCHO細胞が多用される所以である。従って、糖鎖工学的にもCHO細胞によって発現されたタンパク質に付加する糖鎖構造を研究した例は数多い^{13~16)}。

1. 2. 2 付着依存性動物細胞の培養工学的諸問題に関する既往の研究

付着依存性動物細胞に関する培養工学的な諸問題としては、培地に用いる血清の問題を初めとして、マイクロキャリア等の固定化担体、酸素の供給方法、培養状態を把握し解析する技術、モデリングの方法、等が挙げられる。

細胞の増殖や目的タンパク質の生産性に影響が大きい培地については、比較的早い時期から研究が進んでいる。培地中に使用する血清は工業規模で生産する場合にはコスト面で常に問題となり、ロットによるバラツキも考慮しなければならない。従って、本研究においても、血清の使用量を下げたり、血清を全く用いない無血清培養を達成することが非常に重要となる。無血清化の方法としては、基本合成培地成分を改良する方法、Satoらによって開発された血清を適当なペプチド性ホルモンや細胞成長因子の組み合わせで置き換える方法¹⁷⁾、血清濃度を徐々に下げていき最終的に無血清培地に馴化する方法、等がとられる。血清中の成分は多種多様でありタンパク質量も多いため、血清を添加すると目的物質を純粋な形で分離精製することが困難になり収率も低下する。特に医薬品の生産には未知の物質の極微量な混入でも許されないため、構成成分が既知である培地を用いることが、本研究においても重要な目標になる。血清中に含まれる各種因子や成分については数多く同定されており、Griffithsらによって成長因子、ホルモン、付着因子、輸送タンパク、栄養素等に分類されている^{18~19)}。これらの成分を細胞培養の目的に合わせて選択し、必要に応じて添加することが容易になりつつある。

付着性細胞を実験室スケールで培養する場合は、フラスコやローラーボトルが汎用される。しかし、工業規模へのスケールアップを指向する場合は、これらの器具では限界がある。付着性細胞を用いる場合、その固定化担体が問題となる。担体として、

マイクロキャリアをはじめ、ホローファイバーやセラミック担体が開発されている。その中でも、付着性細胞にとってマイクロキャリアの開発は、サスペンション培養を可能にしたばかりでなく、工業規模へのスケールアップも容易にし、応用範囲を飛躍的に拡大した。本研究でも、スケールアップを考慮してマイクロキャリアを取り上げた。マイクロキャリアを利用した細胞培養の方法論等については成書の中に概説されている²⁰⁾。マイクロキャリア培養の場合、工業規模で生産する際には、その使用量によってコスト的に問題が生じたり、細胞増殖や培養環境に影響を及ぼすという報告もある²¹⁾。マイクロキャリアの種類によって、細胞との適合性に大きな差があるため、材質や表面の加工方法などが主な研究の対象となる。Fig.1-1に示すように、キャリア表面上に荷電を持たせて細胞が付着し易いようにしたものや、ゼラチンやコラーゲンなど細胞に適合した材質を用いたもの、また表面積を拡大するために多孔質性を高めたもの等が開発されている。細胞との適合性によって細胞の性質や状態も変わってくるので、より適合したものを選択することが細胞の特質を引き出す決め手となる。段階的に培養スケールを拡大するような場合にも、適合性によっては細胞の培養液内分散と付着性が問題となるため²²⁾、スケールアップする上での課題である。

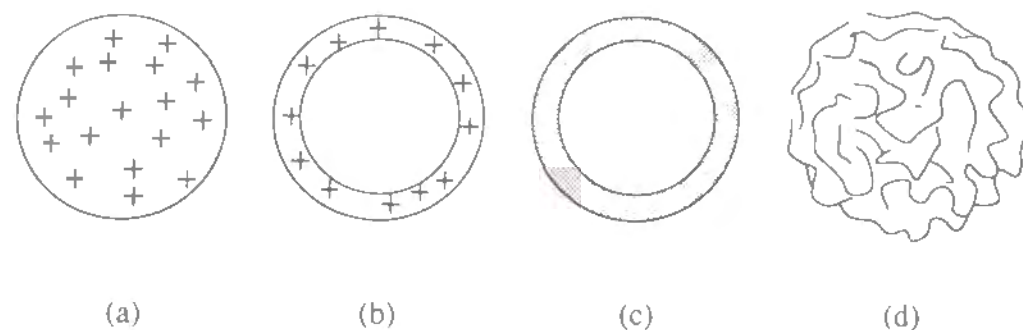


Fig.1-1 種々のマイクロキャリア
(a) ビーズ構造全体に荷電基を分散
(b) ビーズ表層に荷電基を分散
(c) コラーゲン薄層でビーズをコーティング
(d) 多孔質性

動物細胞は細胞壁を持たないため物理的衝撃に弱く、厳しい条件を選択できない。従って、微生物培養で液内に酸素を供給するために用いられる気泡通気は、動物細胞培養では注意しなければならない。また、攪拌速度を上げて酸素移動速度を高めると、せん断応力が増大して細胞に損傷を与える。従って、柔和な条件下でより多くの酸素を供給する方法が研究されている。コイル状に巻いたシリコンや、多孔性のチューブを培養液内に埋没してチューブ内通気によって酸素を供給する方法²³⁾や、

円筒型のステンレスメッシュ内を通気することによって、泡と細胞との接触を回避する方法²⁴⁾など、さまざまな方法が開発されている。酸素通気能力の指標としては、酸素移動容量係数(k_La)がある。種々の通気方法を用いた場合、実験室スケールで達成されている k_La 値が、スケールアップした際に達成できるとは限らない。従って、スケールアップを指向する場合は、生産スケールにおいても達成可能な通気方法を採用すべきである。本研究では通気方法の装置的工夫はあまり行わず、あくまでも k_La 値を指標として実験条件の設定を行った。動物細胞の酸素取込み速度を測定することによって、細胞の酸素要求量を適切に把握することができる²⁵⁾。装置の供給速度と細胞の酸素要求量を把握できれば、適切な通気方法が決定される。

培養状態の良否は、細胞の増殖性や有用物質の生産性によって判断され、これらを向上させるための方策が検討される。培養状態に影響を与える因子は多種におよぶが、それら全てを簡便な方法で分析、測定できるわけではない。酵母等の微生物培養では、グルコースが栄養源として重要な成分であるため、測定技術は比較的発展している。最近ではオンラインでの測定も可能になり²⁶⁾、制御系を構築した研究も報告されている²⁷⁾。動物細胞培養でも、グルコースや乳酸を指標とした生化学的な解析も進みつつある。グルコースの消費や乳酸の生成は、細胞代謝反応の結果であるため、それらの培養液中濃度は細胞増殖性やタンパク質生産性に大きく影響することがわかってきた²⁸⁻³⁰⁾。本研究においても、培養状態の解析のために生化学的パラメータであるグルコース、乳酸の測定を最大限利用した。これらの成分はオンライン測定が可能であるため工学的な発展性が期待できる。

ある評価関数を最大にするためには、影響する因子を同定し相関関係を見つけ出す必要がある。上の例では細胞増殖性やタンパク質生産性を最大にするために、重要因子であるグルコースとの相関関係を数式モデル化することによって、その方策が検討できる。このようなプロセスシステム工学的な方法論は生物反応プロセスでも徐々に適用され成果をあげつつある³¹⁻³⁴⁾。また、培養プロセス制御のための機器や解析手段についても開発が進められている³⁵⁾。生物反応プロセスの動力学的挙動に着目して解析することや³⁶⁻³⁷⁾、重要因子との相関関係を数式化してモデル式を同定することも行われている³⁸⁻³⁹⁾。そのモデル式を利用してシミュレーションを行うことによって、最適化を目指した操作条件や制御方法の設定も可能になる。本研究では最適化問題を解くまでには到らなかったが、生化学的パラメータと細胞増殖特性、生理活性物質生産性との相関関係を明らかにすることによって、生理活性物質の生産という評価関数を最大にするための方策について種々考究することができた。

1. 2. 3 工業的生産のための培養形式に関する既往の研究

大量培養という観点から工業的規模での生産を指向するには、やはりスケールアップ可能な培養形式を選定することが望ましい。代表的なリアクター形式である従来型の攪拌槽型ファーマンターは、インターフェロン⁴⁰⁾やEDF^{41)~43)}等の大量生産培養で実績がある。スケールアップの際に最も問題になるのは、スケールを大きくすると何らかの培養パラメータが変化し⁴⁴⁾、小スケールでの結果の再現性が得られないことである。スケールアップを成功させるためには、スケールアップに影響するパラメータを明確にし、スケールの拡大に伴ってシステムにさまざまな調整を施すことが必要となる⁴⁵⁾。しかし、生物反応ではパラメータの数が一般的に多く、お互いが複雑に干渉し合っているために、スケールアップをより困難なものにしている。そのため化学工学的なアプローチ法が不可欠であり、スケールアップの手順やモデル化によるシミュレーション、無次元式を利用した方法論等が提唱されている^{46)~47)}。

スケールの選択に関連して、培養方法も重要な選定項目の一つである。反応装置の形状から、槽型と管型に分類される。また、操作法からは、回分系、半回分系、連続系に大別される。回分系には単回回分と繰返し回分系があり、生産性から判断すれば繰返し回分系の方が優れている。連続操作においては、槽型反応器をCSTR(continuous stirred tank reactor)、管型反応器をPFR(piston flow reactor)と略記する。CSTR型では培養槽内を種々改良したタイプが数多く考案されている⁴⁸⁾。代表的な例としては、エアリフト型やスピンフィルター型、流動層型がある⁴⁹⁾。スピンフィルター型ではCHO細胞を使用してTPA(tissue plasminogen activator)を生産した例があり、高い細胞密度を達成している⁵⁰⁾。流動層型では、本研究の第6章でも使用したVerax社のものがある⁵¹⁾。CSTR型の特徴は、培養槽内が均一に分散するため、細胞密度や培養液成分に偏りや分布が生じないことである。また装置構造が簡単でもある。一方、PFR型の代表例として、ホローファイバー型やセラミックのマトリックス型がある。これらの特徴は、細胞を高密度化できるため培養槽体積を小さくできることであるが、細胞密度に疎密の分布や、栄養物に濃度勾配が生じるなどの欠点もある。また、細胞を直接観察できないことや、回収することが難しいため段階的なスケールアップが困難なことも欠点である。

大量培養では、培養環境を制御することが大きな課題になる。パーフュージョン培養では経時的に減少する栄養源を補給し、老廃物の蓄積を抑えることができるため、培養環境の変化を小さくして温和な状態を作り出せる。従って、上記で示した種々の培養槽タイプとパーフュージョンを組み合わせることによって数々の成果があげられている^{50)~53)}。回収ラインにフィルターを設置して低分子物質などの不要物のみを系外に取りだし、有用物は系内にリサイクルする方法も開発されている^{54)~55)}。

本研究においては、大量生産の実績が多い従来型の回分槽型式を採用することにした。付着依存性細胞の培養のためにマイクロキャリアを使用する場合、ファーマンター形式では培地の交換が容易に行える。また、培養槽内を攪拌することによって均一な状態が得られるため、スケールアップのための解析が容易である。本研究では、小スケールでの研究成果を、スケールアップして確認するまでには到らなかった。しかし、スケールアップのための要因については把握できたと考えている。

1. 2. 4 トロンボモジュリンに関する既往の研究

本研究で取り上げた生理活性物質であるトロンボモジュリンは、血管内皮細胞の細胞膜上に発現している膜結合タンパク質であり、血液凝固系を調節する重要な役割を演じている。トロンボモジュリンはトロンビンと強い親和性を持ち、トロンビンと結合して複合体を形成することによって、一連の血液凝固反応系を阻害する抗凝固作用を高める^{56)~57)}。ヒト-トロンボモジュリンの遺伝子は、1987年に3つの研究グループによってほぼ同時に単離された^{58)~60)}。構造的には575のアミノ酸をもち、N末端側から、アミノ末端、EGF(epidermal growth factor)様構造、O-グリコシレーション、膜貫通および細胞質内領域、の5つの領域によって構成される糖タンパク質である^{56)~57)}。酵素的な方法を用いて活性部位や結合タンパク質の結合部位、結合様式等が同定されている^{61)~62)}。

1990年にはParkinsonらによって、トロンボモジュリンの膜貫通領域と細胞質内領域を除いた遺伝子を動物細胞に導入して、遺伝子組み換え体トロンボモジュリンが発現された^{63)~64)}。この遺伝子組み換え体トロンボモジュリンは膜貫通領域を持たないため、細胞内で合成された後は、細胞外へ分泌され可溶化して遊離する。可溶性トロンボモジュリンにおいても、本来の活性は保持している^{63)~64)}。遺伝子工学的手法によって生産されたトロンボモジュリンには、O結合型糖鎖とN結合型糖鎖の他に、グリコサミノグリカン側鎖を付加したものが混在していることが明らかにされた⁶³⁾。さらに、名和らによって、形質転換CHO-K1細胞によって発現されたトロンボモジュリンのグリコサミノグリカン側鎖は、コンドロイチン-4-硫酸によって構成されることも示された⁶⁴⁾。グリコサミノグリカン側鎖を付加したトロンボモジュリンは、付加しないものに比べ、*in vitro*^{63)~64)}及び*in vivo*⁶⁵⁾の両方の実験系において、高い比活性を持つことが示されている。このように糖鎖の存在が、タンパク質の持つ生理的機能に大きな影響を及ぼすことがわかりつつある。従って、糖タンパク質の糖鎖構造の解析^{66)~67)}や役割、機能の研究^{68)~69)}が進むにおよび、益々糖鎖工学的な解析が重要となる。それと同時に、本研究の4章でも取り上げるように、糖鎖を付加したタンパク質の生産についても化学工学的なアプローチの重要性が増しつつある。

1. 3 本研究の目的と内容

動物細胞培養を利用して医薬品を生産するには、経済的かつ再現性のある生産方法の確立が重要な課題となる。経済的な生産を達成するには培養形式の選択、無血清化、高生産性の検討が不可欠である。再現性のある培養を確保するには、細胞及び培養液の状態を把握した上で、現象の解析が必要となる。

本論文は、このような諸問題に対し工学的に研究し、培養状態の工学的解析、高生産培養法の確立、生物反応速度を利用したタンパク質生産性の推定アルゴリズムの開発等の結果について述べたものであり、序論、結論、及び2編、全5章により構成される。第1編では、ヒト-トロンプモジュリン(TM)を発現する形質転換CHO-K1細胞の培養特性と高生産性の確立について、第2編では培養生産系の工学的応用として、細胞密度やタンパク質生産量等の状態量を推定する方法の開発について述べた。

第1章は、従来の研究成果を紹介し、本研究の位置づけと目的及び概要を述べた。動物細胞を利用して医薬品を生産する場合には、培養形式や培地組成、さらに付着性細胞ではマイクロキャリア等の基礎的条件が重要である。

第2章では、遺伝子導入によって可溶性ヒト-トロンプモジュリン(rsTM)を発現する付着性の形質転換CHO-K1細胞(CHO(21))を取り扱い、この基礎的培養条件の検討と培養特性の解析を行った。即ち、グルコースや血清の培地中濃度が、細胞培養特性及び生理活性物質生産特性にどのような影響を及ぼしているのかを検討した。また、種々の無血清培地を用いて、生理活性物質の生産性を高める培地について検討した。さらに、マイクロキャリアと細胞増殖特性の関係を解析することによって、細胞の固定化担体としてのマイクロキャリアの最適使用量を検討した。

第3章では、第2章での基礎的条件を基に、スケールアップを指向したミニジャーファーマンターを用いて、繰返し回分系でマイクロキャリア培養を行い、生理活性物質高生産の検討を行った。培養初期に血清含有培地を用いて細胞増殖(増殖期)を行い、一定期間後無血清化して有用物質を生産する(生産期)培養方法を採用した。細胞増殖期の期間や培養液中グルコース濃度、溶存酸素等に着眼して培養特性の解析を行い、生理活性物質の高生産培養を達成するための方法について考究した。その結果、適正な細胞増殖期間の把握と、無血清化後の生産期における溶存酸素、培地中グルコース濃度、培養液回収間隔と生理活性物質生産速度との因果関係を把握し、それらの結果をふまえ長期的かつ高生産培養の操作条件を明らかにした。

第4章では、糖鎖を付加した生理活性物質の培養生産の特性を解析し、糖鎖修飾型生理活性物質を選択的に、かつ効率よく生産する方策について検討した。本研究で用

いた細胞(CHO(21))は、コンドロイチン-4-硫酸によって構成されるグリコサミノグリカン側鎖を付加したrsTM β 体と、側鎖のないrsTM α 体の両方を同時に発現することがわかっている。かつ、rsTM α 体に比べ、rsTM β 体の方が高い比活性を示すため、rsTM β 体の生産量比を高くすることが重要な課題である。本章では、rsTM α 体及びrsTM β 体の発現に対する溶存酸素の影響を考察した。さらに(乳酸生成量/グルコース消費量)($\Delta L/\Delta G$ 比)を指標とし、rsTM β 体の生産性を増大させるための操作条件を明らかにした。

第5章では、培養液中のグルコース、乳酸の濃度を測定し、それらを利用して、細胞数さらにタンパク質生産速度等を推定する方法を開発した。繰返し回分培養系の実験データから、細胞数とグルコース消費速度の相関関係、並びにrsTM生産速度と $\Delta L/\Delta G$ 比の相関関係を見いだすことによって、比グルコース消費速度及び比rsTM生産速度を表すモデル式を導出し、これらのモデル式を推定アルゴリズムの中で適用した。

推定アルゴリズムは、

- ①: グルコース消費速度から、細胞密度
- ②: 細胞密度と比rsTM生産速度の推定値から、rsTMの生産速度と培養液中濃度
- ③: rsTM生産速度から、rsTM β 体とrsTM α 体の生産速度

を推定する部分によって構成される。この推定アルゴリズムの実用性評価を、繰返し回分培養系において検討した。

第6章では、CHO(21)を連続培養系に適用した。培養初期に用いる血清使用量のさらなる低減を目指すと同時に、培養特性の解析を行った。さらに第5章で開発した推定法を無血清連続培養へ適用し、その実用性の評価を行った。回収培養液内のrsTM濃度の実験値と推定結果を比較し、繰返し回分培養系で導出したモデル式が連続系においても適用できることを明らかにした。

第7章は、結論として本論文で得られた結果を総括し、今後の展望をまとめた。

第 1 章の記号表

| | |
|-----------------------|------------------------|
| G | : 培養液中グルコース濃度 [g/l] |
| L | : 培養液中乳酸濃度 [g/l] |
| $\Delta L / \Delta G$ | : 乳酸生成量／グルコース消費量 [%] |

第 1 編

付着依存性動物細胞を用いた

生理活性物質生産法の開発

第2章 付着依存性動物細胞の基礎的な培養特性

2. 1 緒言

動物細胞の培養を工学的に研究するためには、細胞の種類を選択に始まり、培養スケール、培養方法や装置、培地の種類、マイクロキャリア等について、定量的な解析手法によって適切に選定することから始めなければならない。

本研究で用いた形質転換CHO-K1細胞(CHO(21))は付着依存性細胞であり、何らかの担体に付着して生存し増殖する。本細胞は浮遊して増殖することも可能だが、生理活性物質の生産性が極端に下がるため、付着を前提とした培養方法が望ましい。付着細胞の培養方法としては多段プレート式⁴⁰⁾、ホローファイバー式やマイクロキャリア方式等が挙げられるが^{20)、19)、70)}、本研究ではスケールアップの可能性や研究実績などさまざまな要因を考慮して、マイクロキャリア培養法を採用し検討を行った。

実験室規模の基礎検討のために、まず、フラスコスケールを基本として基礎実験を行い、次に、マイクロキャリア培養の基礎解析にはスケールアップの容易なミニジャーファーマンターを用いて実験を行った。スケールの選択に依存して、培養方法も重要な選定項目の一つである。マイクロキャリア培養では攪拌を停止することによって、細胞の付着したマイクロキャリアは沈降する。従って、培養液と細胞との一時的分離が容易であるため、培養液交換が簡単に行える。さらに細胞が生存する限り目的物質を生産し続けるという利点を生かして、生産形式としては繰返し回分系を採用することとした。

本章では、本細胞の無血清化マイクロキャリア培養に、より適した条件を探索するため、細胞増殖速度や生理活性物質生産速度等の生物反応速度を指標にして解析を行った。細胞の増殖や目的タンパク質の生産性に最も影響を及ぼす培地やマイクロキャリアの選定は重要である。まず、グルコースや血清等の培地中成分に依存する細胞増殖特性や生理活性物質生産特性を解析した。次に、無血清化培養の検討を行った。本細胞の場合、培養の初めから無血清化することはできなかったため、培養初期には血清含有培地を用いて細胞増殖（増殖期）を行い、一定期間後無血清培地と交換して有用物質を生産する（生産期）培養方法を採用した。その際、目的物質の生産性が最も高い無血清培地を選択することを第一目的とした。

マイクロキャリアの使用量を多くするとコスト的な問題が生じるため、適切な使用量を設定することが重要である。その種類によって、細胞との適合性に大きな差があるので、材質や表面積なども評価の項目になる。本研究においても、種々のマイクロ

キャリアを検討したが、用いる培地の種類によっても細胞とマイクロキャリアの相性が異なってくるので、選定には時間を要した。マイクロキャリア濃度と細胞増殖特性の関係を解析し、細胞の固定化担体としてのマイクロキャリアの最適な使用量を把握することと、血清と同様に高価なマイクロキャリアの使用量を削減することを目指して検討を加えた。

2. 2 実験材料と実験方法

(実験材料)

基本合成培地としてDMEM(High glucose) (日本製薬)、DMEM(Low glucose) (日本製薬)、T-medium (日本製薬)、 α -MEM (日本製薬)、MEM-NEAA(Low glucose) (日本製薬)、IMDM (日本製薬) をそれぞれ用いた。血清は細胞増殖や目的物質の生産性について、ロット検査を行った牛胎児血清(Fetal bovine serum : FBS) (Gibco社製) を用いた。T+ITES培地中の添加物としては、インスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウムを含有するDaigo-ITES (日本製薬) を希釈して使用した。希釈後の培地中標準濃度は、それぞれインスリン：2.0mg/l、トランスフェリン：2.0mg/l、エタノールアミン：0.122mg/l、亜セレン酸ナトリウム：0.009mg/lである。

細胞は、CHO-K1細胞にプラスミドpRS7TM-neoを導入して形質転換を行った付着依存性CHO-K1-RS7TMneo-No.21細胞(CHO(21))を使用した⁶⁴⁾。T25型フラスコ(Corning社製)を用いて、DMEM(High glucose)+10%FBS培地で2日～3日に一回培地交換しながら維持培養を行い、増殖が安定した細胞をそれぞれの実験に使用した。

マイクロキャリアは、多孔性ゼラチン質のCultiSpher-G (Percell Biolytica社製) を使用した。Ca²⁺、Mg²⁺を含まないリン酸緩衝液(PBS) (日本製薬) で膨潤した後、121℃で20分間滅菌し、さらに無菌PBSで洗浄したものをマイクロキャリア培養実験に使用した。

(培養方法)

本章2. 3. 1のグルコース濃度と血清濃度の検討実験、及び2. 3. 2の無血清培地の検討実験では、T25型フラスコを用いて静置培養を行った。培養液仕込み量は5ml、細胞播種密度は 1×10^5 cells/mlとしてCO₂インキュベータ内 (5%CO₂、37℃) で実験を行った。培地は、1回目が細胞を播種してから3日後、その後はほぼ2日に1回交換した。

2. 3. 3のマイクロキャリア培養実験では、3L-ミニジャーファーマンター(3LFM) (イワシヤ社製) を用いた。3LFM内には溶存酸素(DO)計、温度コントロールユニット、培養液サンプリングシステム、培地流入口、培養液回収口、通気流入口及び排気口をそれぞれ装着した。マイクロキャリア濃度による依存性を検討するために、その濃度をパラメータとして、1g/l、2g/l、4g/l、6g/lに設定してそれぞれの実験を行った。その他の培養条件は同一とし、培地仕込量は約1l、細胞播種密度は約 1×10^5 cells/ml、撹拌速度は40rpm、通気条件は2.0l-ガス/minの流速で上面通気法として実験を行った。

2.0l-ガス/minの流量組成は、N₂を75%、O₂を20%、CO₂を5%として、ガス流量調節器 (Kofloc GM-3A : 小島製作所) で調節した。培地交換時は撹拌を停止し、細胞の付着したマイクロキャリアが充分沈降した後、浮遊した細胞を含む上澄み液だけを回収し、その後に新鮮培地を同量供給した。培地交換間隔は最初が3日後、その後は2日毎とした。

(測定方法)

T型フラスコを用いた静置培養実験では、上澄み液を回収し、YSI Model 2000 Glucose & Lactate Analyzer (YSI社製) でグルコース及び乳酸の濃度を測定した。上澄み液中のrsTM濃度は、サンドイッチ型ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法⁶⁴⁾によって測定した。細胞数の測定は、フラスコ底面に付着した細胞をトリプシン-EDTA溶液にて剥し、懸濁した後コールターカウンターで計測した。

3LFMを用いたマイクロキャリア培養では、細胞が付着したマイクロキャリアを含む培養液をサンプリング口から約3ml回収し、15ml遠沈管に移して3000rpm、10分間遠沈処理して細胞層と上澄み層に分離した。細胞数の計測は、細胞層をサンプリング時と同量のクリスタルバイオレット液(0.1M citric acid with 0.1% (w/w) crystal violet)に再懸濁し、37℃のCO₂インキュベータ内に1昼夜放置した後、放出された細胞核を顕微鏡下計測をした²²⁾。死細胞由来の細胞核は着色の差によって区別し、主に生細胞由来の細胞核のみを計測した。

2. 3 実験結果と考察

2. 3. 1 細胞増殖速度と生理活性物質生産速度に及ぼす培地中グルコース濃度と血清濃度の影響

培地中に含まれるグルコース濃度の影響を調べるため、DMEM(High glucose:4.5g/l)+10%FBS 培地とDMEM(Low glucose:1g/l)+10%FBS 培地を用いてT型フラスコ中で培養実験を行った。細胞播種から3日目までの培養初期における比細胞増殖速度は殆ど同じ値を示し、グルコース濃度の影響がないことがわかった。しかし、到達細胞密度に関しては、High glucoseの場合は、Fig.2-1aに示すように 9.5×10^6 cells/mlであったのに対し、Low glucoseでは 5.9×10^6 cells/mlであり、1.5倍以上の開きが生じた。Fig.2-1bに示すようにHigh glucoseを用いた場合は、3日目以降においても培養液交換時にグルコースが残存しているのに対し、Low glucoseでは殆ど消費されている。培地中のグルコー

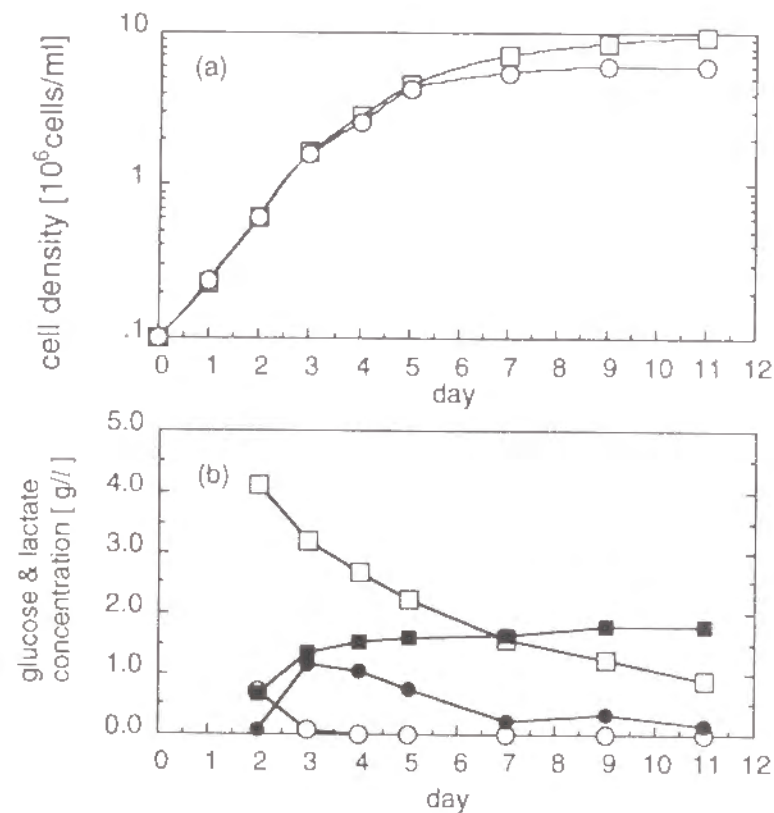


Fig.2-1 培地中グルコース濃度の影響

DMEM(High glucose:4.5g/l)+10%FBS 培地とDMEM(Low glucose:1g/l)+10%FBS 培地を用いてのT型フラスコ培養実験

- (a) 細胞密度の経時変化 □: High glucose、○: Low glucose
 (b) 培養液中グルコース濃度の経時変化 □: High glucose、○: Low glucose
 乳酸濃度の経時変化 ■: High glucose、●: Low glucose

ス濃度以外の培養条件がすべて同じであることを考慮すると、到達細胞密度の差はグルコース濃度の違いによってもたらされており、グルコース濃度が細胞の増殖を抑制しているものと結論できる。乳酸濃度については、High glucoseの乳酸濃度の方が高い値を示している。また、High glucoseの方が、乳酸生成量/グルコース消費量 ($\Delta L / \Delta G$ 比) が高く、グルコースを効率的に資化できていない。培養液中濃度が高いとpHを下げるなどの作用があり、むしろ阻害的要因になる。High glucoseの実験において、さらにグルコースを効率的に資化でき、乳酸の生成を抑制することが可能ならば、より一層培養状態がよくなることが予想される。

一方、生理活性物質(rsTM)の生産速度について考察すると、Fig.2-2に示すようにrsTM発現濃度はどちらの実験も同じような傾向(Fig.2-2a)を示しており、グルコース濃度の差による影響は認められない。従って、比rsTM生産速度を比較すると当然Low glucoseの実験の方が高く、単位細胞当りのrsTM生産活性が高いことを表している(Fig.2-2b)。これは、Low glucoseの実験の $\Delta L / \Delta G$ 比が、High glucoseの実験より低

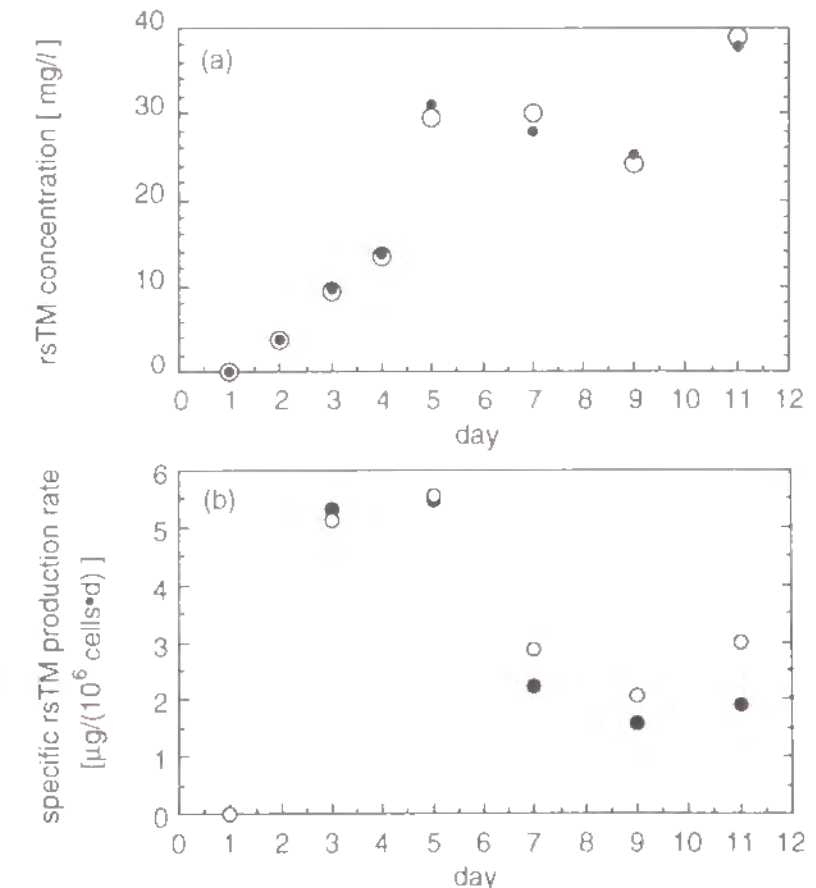


Fig.2-2 培地中グルコース濃度のrsTM生産性に及ぼす影響

実験条件はFig.2-1と同じ。

- (a) 培養液中rsTM濃度の経時変化 ●: High glucose、○: Low glucose
 (b) 比rsTM生産速度の経時変化 ●: High glucose、○: Low glucose

いことから判断すると、Low glucoseの場合の方が細胞数は少ないが、個々の細胞がグルコースを効率良く資化しているため代謝活性が高いことになる。即ち、タンパク質の生産性には、培地中に含まれるグルコース濃度が直接影響しているのではなく、効率的に栄養源が代謝されることが重要であることを示唆している。

培地中の血清濃度の影響を調べるため、T+ITES培地に種々の濃度の血清を加えた実験を行い、その培養特性について解析し考察を行った。まず、細胞増殖特性に対する血清濃度の影響を検討した。細胞を播種してから3日間の細胞増殖特性は、指数関数的であった。Table 2-1に示すように、10%と5%の場合で細胞倍加時間が16.7h、比細胞増殖速度が0.042 1/hでありほぼ同じ値を示したが、それ以下の血清濃度を用いた場合では倍加時間は大きくなり比細胞増殖速度が下がっている。比細胞増殖速度の結果をFig.2-3にも示した。この結果より、だいたい血清濃度5%が、培養初期の細胞増殖速度の分岐点になっていることがわかる。一方、到達細胞密度はTable 2-1に示すように血清濃度が0～10%の範囲では、血清濃度が高い方が到達細胞密度も高くなっている。

Table 2-1 培地中血清濃度の影響

| | FBS | 倍加時間 | μ | 到達細胞密度 | rsTM濃度 | 比rsTM生産速度 |
|----------------|-----|-------|-------|----------------------------|--------|--------------------------------------|
| | | 初期3日間 | 初期3日間 | | | |
| | [%] | [h] | [1/h] | [10 ⁶ cells/ml] | [mg/l] | [μ g/(10 ⁶ cells·d)] |
| Ti+10%FBS | 10 | 16.7 | 0.042 | 5.49 | 30.3 | 4.35 |
| Ti+ 5%FBS | 5 | 16.7 | 0.042 | 4.75 | 19.1 | 3.24 |
| Ti+ 3%FBS | 3 | 17.5 | 0.040 | 4.54 | 16.8 | 2.91 |
| Ti+ 1%FBS | 1 | 18.7 | 0.039 | 4.62 | 16.2 | 2.63 |
| T+ITES | 0 | 21.5 | 0.034 | 3.52 | 13.9 | 2.96 |
| D(Low)+10%FBS | 10 | 16.8 | 0.041 | 6.01 | 30.7 | 3.35 |
| D(High)+10%FBS | 10 | 16.7 | 0.042 | 9.47 | 30.6 | 2.80 |

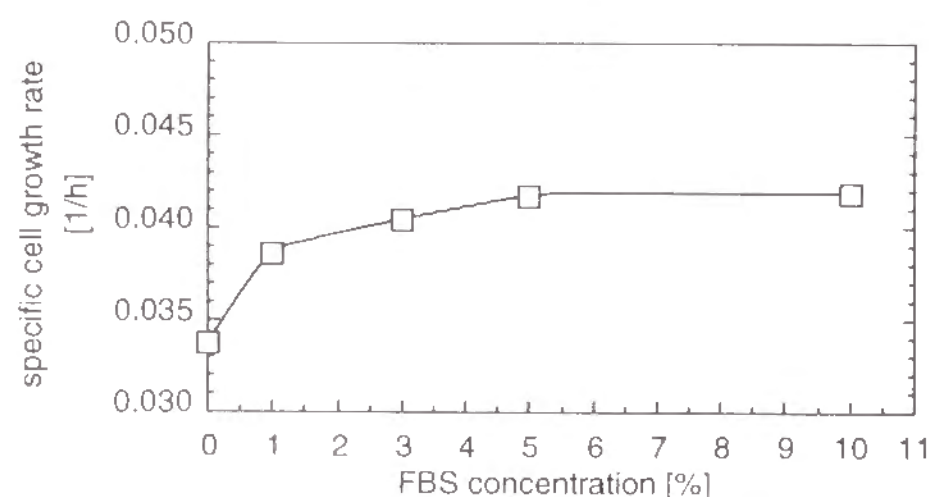


Fig.2-3 比細胞増殖速度に及ぼす培地中血清濃度の影響
(細胞播種から3日間の比増殖速度)

Fig.2-4には培養初期の比細胞増殖速度に対して到達細胞密度の値を示したが、培養初期の比細胞増殖速度が大きいほど到達細胞密度も高くなっていることがわかる。従って、初期の比細胞増殖速度が後々の細胞密度にまで影響しており、到達細胞密度を高くするためには初期の比細胞増殖速度を高く維持する必要があることを示唆している。

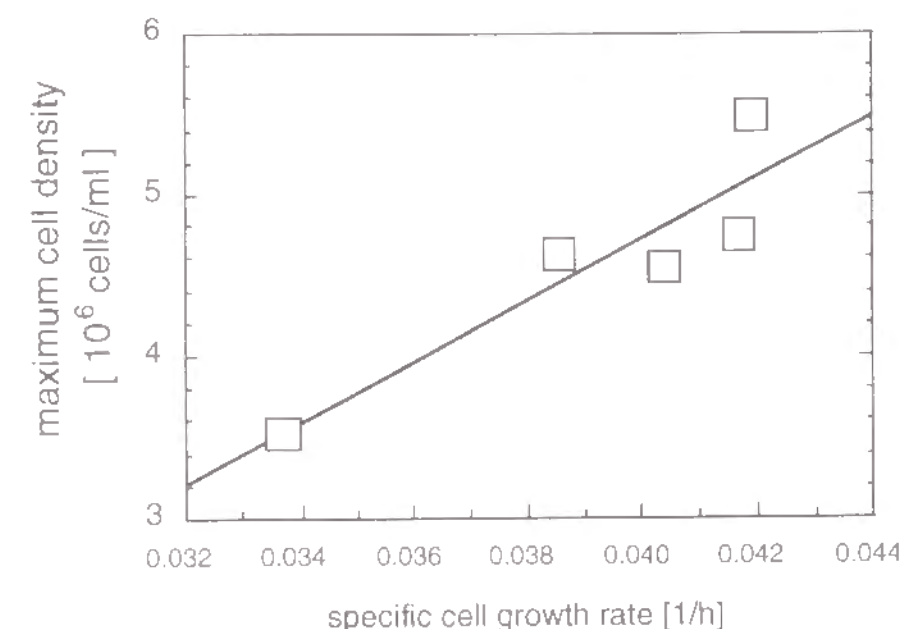


Fig.2-4 培地中血清濃度を変えた場合の比増殖速度
(細胞播種から3日間)と到達細胞密度の関係

次に、生理活性物質(rsTM)生産性に対する血清濃度の影響を検討した。Fig.2-5aには血清濃度に対する回収培養液中rsTM濃度の平均値(4バッチサイクル)を示した。血清濃度が高い方が細胞密度も高く、rsTM濃度も高い値を示している。Fig.2-5bには比rsTM生産速度の平均値を示したが、やはり血清濃度が高い方が比rsTM生産速度も高くなっている。これらの結果より、回収培養液中のrsTM濃度が高血清濃度培養において高い値を示したのは、高血清濃度において細胞密度が高いためばかりではなく、個々の細胞自身のrsTM発現能力も増大したためであることがわかった。

最適な血清濃度は生理活性物質の生産性と、使用する血清の経済性という2つの側面から評価しなければならない。細胞自身が目的物、即ち生産物であるなら、本培養系では5%血清が最適値となるが、分泌される生理活性物質が生産物である本培養系では、上に示した2つの評価基準にそって総合的に判断しなければならない。

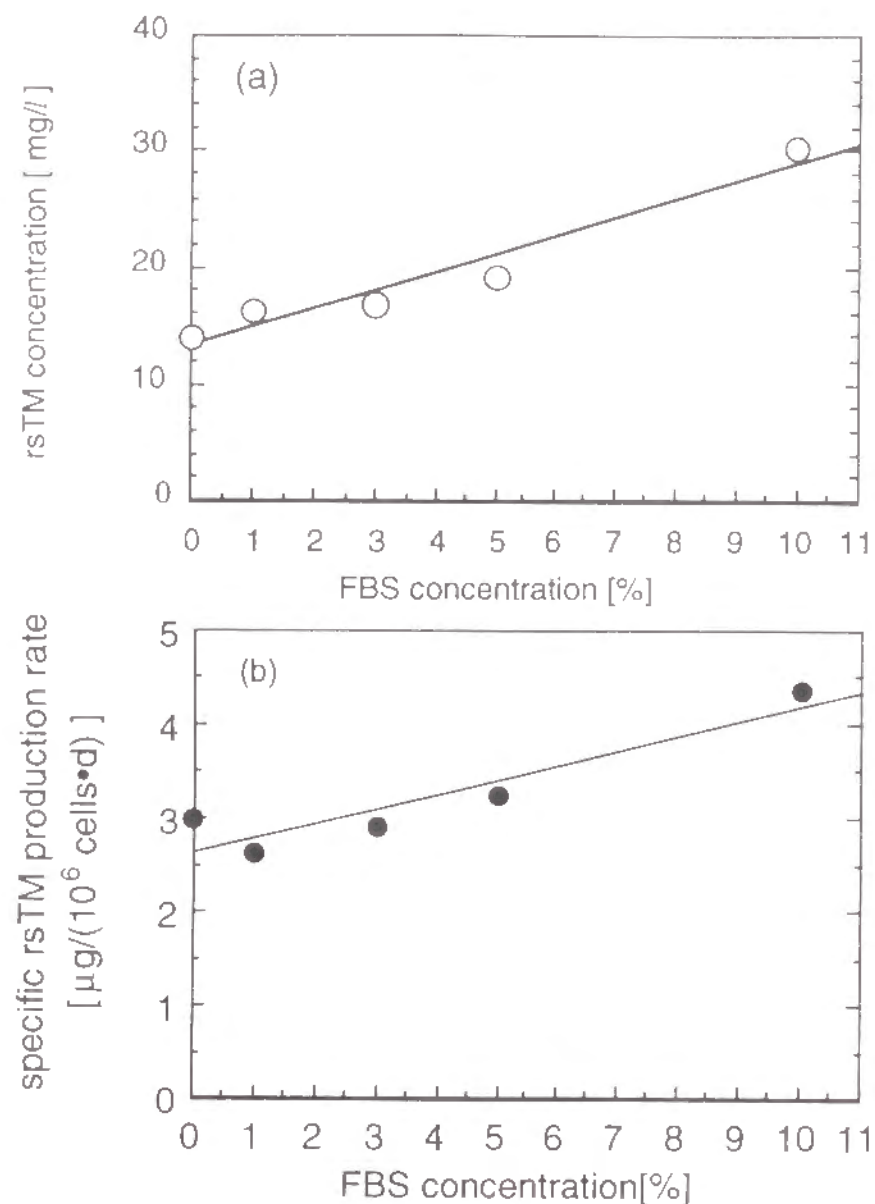


Fig.2-5 rsTM生産性に及ぼす培地中血清濃度の影響
(a) 培養液中rsTM濃度、(b) 比rsTM生産速度

2. 3. 2 生理活性物質生産特性に対する無血清培地の検討

培養初期から無血清培地中で培養を開始した場合では、T型フラスコ表面上への細胞の付着、細胞の増殖やトロンボモジュリンの生産能力の点から、良好な培養の維持は不可能であった。そこで培養初期は血清含有培地を用いて細胞を増殖させ、細胞の状態を良好に保つことによってトロンボモジュリン生産能力の高い細胞を確保する必要があることがわかった。

培養初期に血清含有培地(DMEM(high glucose)+10%FBS)を用いて細胞増殖を行い、一定期間(3日~5日)後、無血清化する培養実験をT型フラスコを用いて実施した。無血清培地に交換した後は、2日毎に培養液を回収し新鮮な培地と交換した。検討した無血清培地の種類はTable2-2に示した通りである。カラム1の実験では、DMEM(Low)、T-medium、T+ITESを検討したが、ITES(インスリン、トランスフェリン、エタノールアミン、亜セレン酸ナトリウム)を含む場合においてのみ、細胞は無血清化後もT型フラスコ表面上への付着を維持し、rsTMの発現量も高い値を示した。一方、ITESを含まない培地では、無血清化後に細胞は剥離し良好な培養は維持できず、rsTM生産量も培地交換とともに低下していった。カラム2で示す実験においても同様な結果となった。カラム3の実験では、DMEM(High)にITESを加えた培地と加えない培地を使用したが、ITESを加えた場合では、やはり細胞の維持も良好でありrsTMの生産性も高い値を示した。しかし、T培地にITESを加えた場合の方が、DMEM+ITESよりも1.5倍の生産性が得られた。以上の結果より、無血清化後も細胞の状態を良好に保ち、rsTMの生産性を向上させるためにはITESの存在が不可欠であり、さらにT培地を用いることでrsTMの生産性を一層向上させ得ることがわかった。

次にカラム4~5の実験において、ITES濃度を変えて培養を行い、rsTM生産性に対するITES濃度依存性について検討した。ITES濃度の"×1"とは2.2(実験材料)で示したそれぞれの濃度を意味しており、実験ではこの濃度を基準とした。カラム4では"×10"の場合にrsTM平均濃度は最も高い値を示しているが、基準値の10倍のITESを用いる程の結果ではなかった。一方、カラム5の実験では基準値よりも低いITES濃度を用いたが、基準値において一番高い生産性を示したものの、カラム4と同様、ITES濃度依存性はそれほど認められなかった。以上の結果より、基準値の10倍から0.05倍の範囲では、細胞の維持やrsTM生産性に対してITES濃度依存性は認められず、ITES使用量を低減することが可能であることがわかった。

Table 2-2 無血清培地の検討

| | 平均 rsTM 濃度 [mg/l] | | | | 平均 rsTM 濃度 [mg/l] | |
|---------------------|------------------------|------|------|-----------------------|------------------------|------|
| | カラム1 | カラム2 | カラム3 | | カラム4 | カラム5 |
| DMEM(Low glucose) | 6.0 | - | - | T-medium+ITES(x10) | 24.1 | - |
| DMEM(High glucose) | - | 5.7 | 7.9 | T-medium+ITES(x5) | 22.0 | - |
| DMEM(High)+ITES | - | - | 21.8 | T-medium+ITES(x1) | 22.7 | 24.7 |
| T-medium | 4.6 | - | - | T-medium+ITES(x0.5) | 21.1 | 22.8 |
| T-medium+ITES | 16.5 | 30.8 | 32.1 | T-medium+ITES(x0.25) | - | 22.9 |
| a-MEM(High glucose) | - | 6.2 | - | T-medium+ITES(x0.125) | - | 21.9 |
| MEM-NEAA(Low) | - | 5.7 | - | T-medium+ITES(x0.05) | - | 21.6 |
| IMDM | - | 7.0 | - | - | - | - |

2. 3. 3 マイクロキャリアの選定とその濃度による細胞増殖特性

マイクロキャリアの性質によって、細胞の付着性や増殖形態が大きく異なるため最適なマイクロキャリアを選択することが重要である。まず初めに、1章でも紹介したような種々のマイクロキャリアを検討した。CHO(2I)の場合、荷電基を持つマイクロキャリアは、無血清化した際、細胞がキャリア表面から剥離してしまうため無血清培養が不可能であった。また、生産物であるトロンボモジュリンが、静電的にマイクロキャリアに吸着されることも実験的に明らかになり、本培養系に適さないことがわかった。コラーゲンコーティングされたマイクロキャリアやゼラチン質の多孔性マイクロキャリアについても検討した結果、細胞の付着性や無血清化における培養状態において良好な結果が得られた。多孔質性のマイクロキャリアの方が、単位当りの表面積が大きく、細胞の増殖性も良好であったため、本研究ではPerCELL Biolytica社製のCultiSpher-Gを採用することとした。CultiSpher-Gの性質をTable 2-3に示す。

Table 2-3 CultiSpher-Gの性質

| | |
|------------------------------------|-------------------|
| 材 質 | 100%ゼラチン |
| 密 度 [g/ml] | 1.04 |
| ビーズ直径 d_{50} [μm] | 220 |
| ビーズ直径 d_{5-95} [μm] | 170-270 |
| およそのビーズ数 [個/g-乾燥] | $2-3 \times 10^6$ |
| 膨潤係数 [ml/g-乾燥] | 13-15 |

マイクロキャリア濃度として1g/l, 2g/l, 4g/l, 6g/lを用いて、培養液中の細胞密度に及ぼす影響を比較検討した。培養実験は3L-ミニジャーファーマンター(3LFM)を用い、培地仕込量を1lとした。使用培地はDMEM(High glucose)+10%FBS、細胞播種密度は約 1×10^5 cells/ml、攪拌速度は40rpm、通気条件は2.0l-ガス/min、培地交換間隔は最初が3日後、その後は2日毎とした。

細胞の播種から3日間もしくは4日間の細胞増殖の様子をFig.2-6に示した。その間の比増殖速度(μ)の平均値をTable 2-4に示す。どの実験でも、フラスコ実験の0.042 1/hよりも若干小さい値を示しているものの、細胞は指数関数的に増殖しており、マイクロキャリア濃度の違いによって細胞増殖の有意差は認められなかった。

Fig.2-7は、培養初期におけるマイクロキャリア上での細胞増殖の様子を示した顕微鏡写真である。これらはマイクロキャリア濃度が1g/lの実験であり、(a)が細胞播種時、(b)が培養2日目、(c)が4日目の結果である。時間の経過とともに細胞数が増加していく様子が見てとれる。

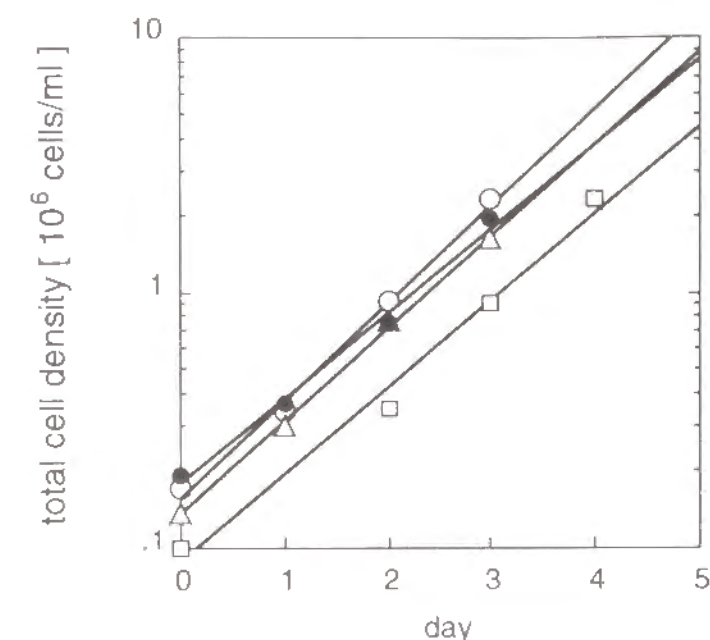


Fig.2-6 初期細胞増殖速度に及ぼすマイクロキャリア濃度の影響
マイクロキャリア濃度 ○: 1g/l、□: 2g/l、△: 4g/l、●: 6g/l

Table 2-4 マイクロキャリア濃度の検討

| マイクロキャリア濃度 | FBS | Dt | μ | 細胞付着率 | 総細胞収率 | 付着細胞収率 |
|------------|-----|--------------|----------------|--------------------------------|--|---|
| [g/l] | [%] | 初期3日間 [h] | 初期3日間 [1/h] | until 2nd-medium change [%] | total(until 2nd MC) [10^6 cells/g-carrier] | on-carrier(until 2nd-MC) [10^6 cells/g-carrier] |
| 1 | 10 | 19.1 | 0.037 | 61.5 | 3.32 | 2.08 |
| 2 | 10 | 20.6 | 0.034 | 66.3 | 1.60 | 1.02 |
| 4 | 10 | 18.1 | 0.039 | 72.9 | 0.48 | 0.35 |
| 6 | 10 | 20.1 | 0.035 | 85.4 | 0.48 | 0.43 |
| T-flask | 10 | 16.6 | 0.042 | - | - | - |

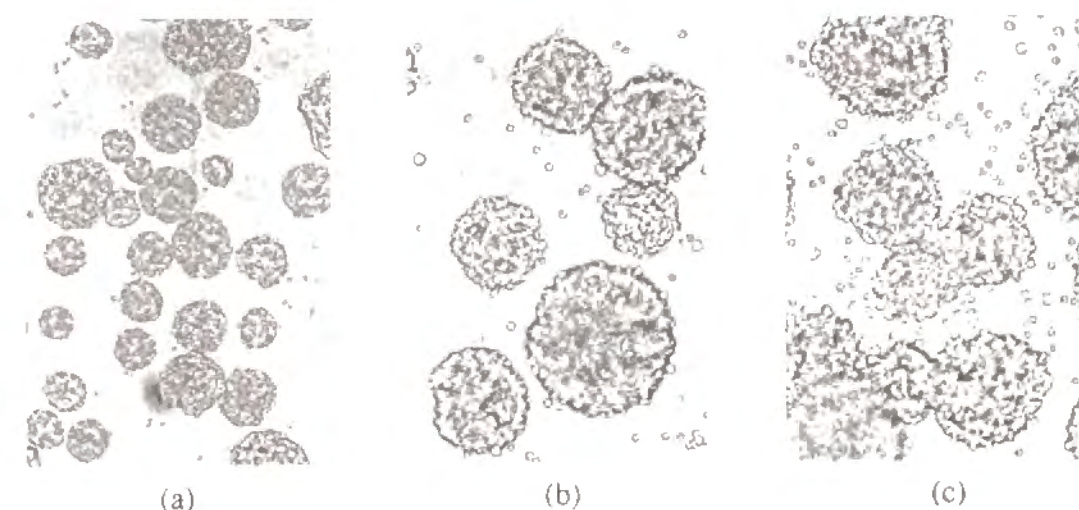


Fig.2-7 マイクロキャリア培養における細胞増殖の顕微鏡写真
(a): 細胞播種時、(b): 培養2日目、(c)培養4日目

CHO(21)は本来付着依存性細胞であるが、浮遊の状態でも生存かつ増殖することが可能である。しかし、付着している状態の方が細胞の安定性は高く、本実験系ではrsTMの生産性も高いことがわかっている。従って、付着している状態の細胞を多く増殖させることが、rsTMの生産性を高める一つの方策となる。Fig.2-8にはマイクロキャリアに付着している細胞と浮遊している細胞の総数を測定した結果(Fig.2-8a)と、マイクロキャリアに付着している細胞のみを測定した結果(Fig.2-8b)を示した。到達細胞密度を比較すると細胞総数、付着細胞数ともにマイクロキャリア濃度依存性は認められなかった。

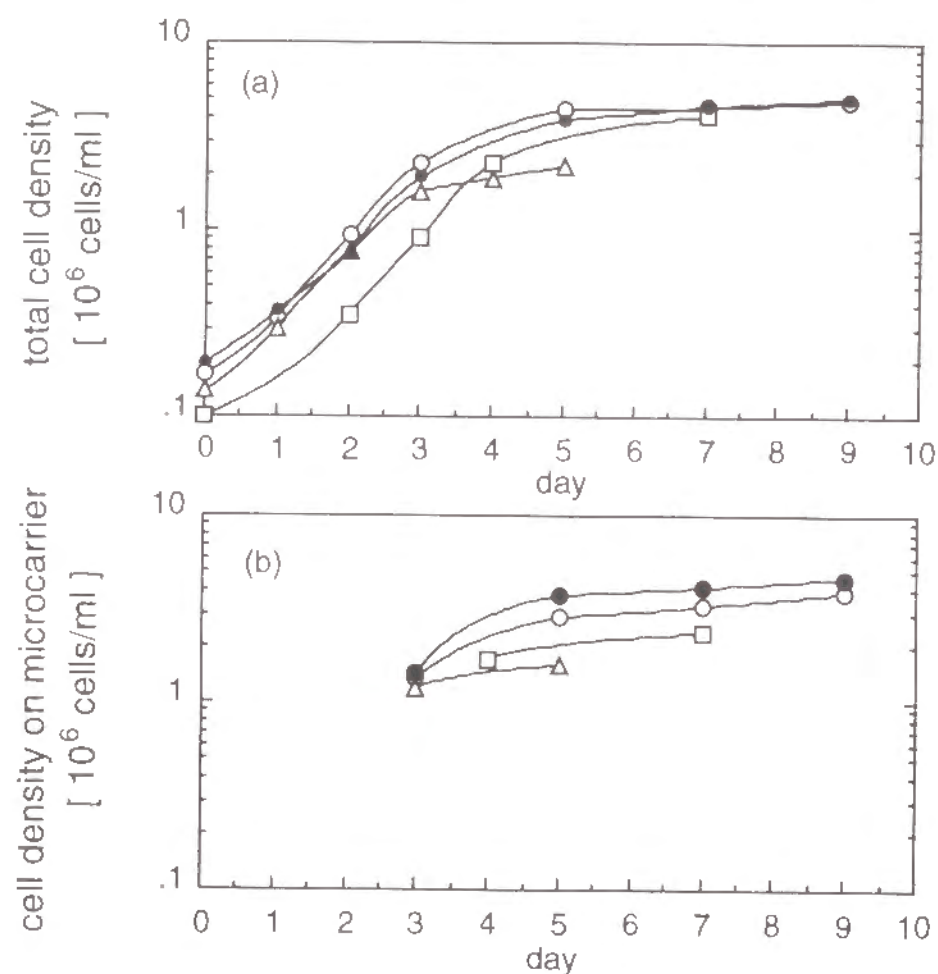


Fig.2-8 細胞増殖性に及ぼすマイクロキャリア濃度の影響
(a) 総細胞密度の経時変化
(b) マイクロキャリアに付着している細胞の密度
マイクロキャリア濃度 ○: 1g/l、□: 2g/l、△: 4g/l、●: 6g/l

細胞総数に対する付着細胞の割合（付着比率）の値を、マイクロキャリア濃度に対してプロットした結果がFig.2-9aである。明らかにマイクロキャリア濃度が大きい程、付着比率も高くなっているが、1g/lを基準にした場合(61.5%)、マイクロキャリア濃度を2g/l、4g/l、6g/lという量を用いているにもかかわらず、それらの使用量に匹敵するだけの付着比率は得られていない。また、マイクロキャリア1g当りの細胞収率では(Fig.2-9b)、1g/lの場合が最高でありマイクロキャリアが効率よく利用されている。以上の結果より、経済的効果も含めて判断すると、1g/lのマイクロキャリア使用量で必要十分な細胞数が得られるとの結論を得た。

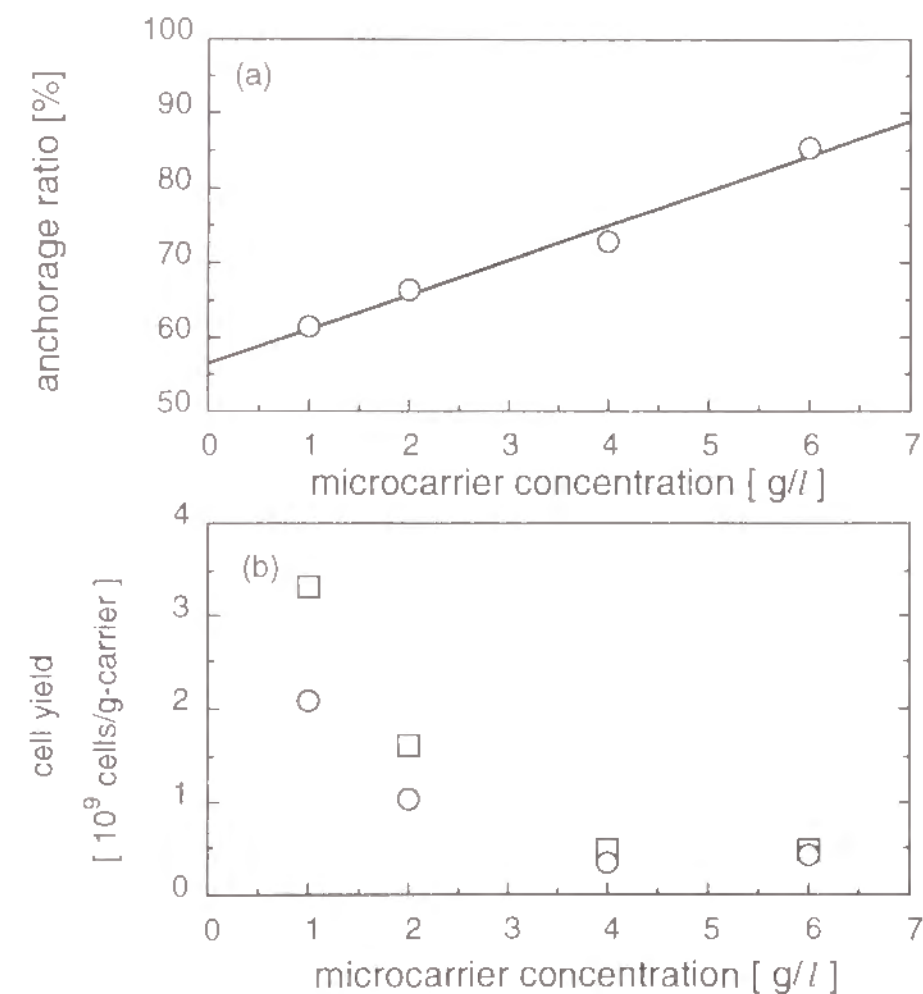


Fig.2-9 細胞付着率および細胞収率のマイクロキャリア濃度依存性
(a) 細胞付着率
(b) 細胞収率 ○: マイクロキャリアに付着している細胞
□: 総細胞

2. 4 結言

本章ではCHO(21)を用いて、培地組成やマイクロキャリアについて種々の検討を行った結果、数々の有益な結果が得られた。

- ①：グルコース濃度により到達細胞密度が低下する。
- ②：培地中の血清濃度を5%まで下げても、初期の細胞増殖速度には影響がない。
- ③：培地中の血清濃度が高いほど、到達細胞密度は高くなる。
- ④：培地中の血清濃度が高いほど、rsTMの生産性は高くなる。
- ⑤：無血清培地にITESを添加することによって、細胞の状態が良好に維持でき、rsTMの生産性も向上する。
- ⑥：マイクロキャリア濃度が1g/l～6g/lの範囲では、細胞の増殖性に有意差は無く、1g/lの濃度で十分な細胞数が得られる。

これらは、動物細胞培養を用いて有用物質の経済的な生産を行うためには、極めて重要な結果である。培地中グルコース濃度や血清濃度に依存する細胞培養特性及び生理活性物質の生産特性を明らかにすることによって、高密度培養と高価な血清使用量の削減を可能にした。細胞増殖のために培養初期には血清を用い、その後無血清化を行う培養方法によって、無血清化培養を確立することができた。また、無血清下での生理活性物質の発現には、ITESの存在が大きな効果をもたらすことも明らかにした。無血清化培養ではダウンストリームとしての精製工程の負荷を縮小することも可能となる。マイクロキャリアについては、ゼラチン質の多孔性のものが本研究の細胞に最も適していた。また、培養液中のマイクロキャリア濃度と細胞増殖特性の関係を検討することによって、細胞の固定化担体としてのマイクロキャリアの最適使用量を明らかにし、血清と同様に高価なマイクロキャリアの使用量を削減でき、経済的な生産を達成した。

これに続く最適化やスケールアップ検討がうまくいくかどうかは、これらの基礎的項目の結果に大きく依存しており、良好な結果を得るための土台になる。本章の結果は、その意味においても十分に満足するものといえる。

第2章の記号表

| | |
|-----------------------|----------------------|
| D_t | : 細胞倍加時間 [h] |
| G | : 培養液中グルコース濃度 [g/l] |
| L | : 培養液中乳酸濃度 [g/l] |
| $\Delta L / \Delta G$ | : 乳酸生成量／グルコース消費量 [%] |
| μ | : 比細胞増殖速度 [1/h] |

第3章 ミニジャーファーマンターを用いた 繰返し回分マイクロキャリア培養系における 生理活性物質の高生産培養

3. 1 緒言

前章では、動物細胞培養における基本的な条件について考察を行い、CHO(21)の増殖速度や生理活性物質の生産性の面から無血清化マイクロキャリア培養の基礎的培養条件の設定を行った。スケールアップを指向し、培養をより最適な状態に近付けるためには、無血清化マイクロキャリア培養のダイナミックな培養状態を、生物反応速度に着目して解析し考察を加えることが有効である。

動物細胞培養では、さまざまな酸素供給方法が考案されていることは1章で述べたが²³⁻²⁵⁾、酸素不足が細胞に対してどのような影響を及ぼすかを検討することによって、適切な溶存酸素濃度を把握することが重要である。酸素不足はもちろんのこと、酸素供給過多についても細胞に与える影響は大きい。フラスコやローラーボトルを使用した培養では、主に酸素供給源として空気を標準とした方法がとられる。我々の基礎的実験においても、これらのスケールの培養実験で好結果が得られており、その結果に基づいて溶存酸素濃度の設定を行った。

培養状態の良否を判断するためや、生化学的な状態変数と細胞状態の相関関係を見いだすことを目的として、グルコース²⁸⁻²⁹⁾、³³⁾、乳酸³⁰⁾、グルタミン³⁴⁾やアンモニア³⁴⁾、さらにはアミノ酸⁵²⁾等が、その指標として研究されている。特にグルコースや乳酸の分析方法は進んでおり、オンラインでの計測も可能である²⁶⁻²⁷⁾。動物細胞培養の場合、乳酸の生成はグルコース代謝の結果である。微生物の培養では、酸素が充分な環境ではグルコースが解糖系で分解され、さらにTCAサイクルまで代謝が進行するため、良好な培養状態が得られることがわかっている⁷¹⁾。動物細胞培養においても、グルコースの代謝と細胞活性との関係、さらには有用物質の生産性との相関関係を把握することが課題である。また、グルコースの代謝は、溶存酸素濃度とも直接関係していることが予想されるため、これらの関係を明らかにすることによって、最適な培養条件の把握と良好な培養状態の実現が可能となる。生物学的な細胞の性質や特徴を把握することによって初めて、装置特性をさらに生かすことにも結びつく。

本章では、培養初期の血清を用いる細胞増殖の期間、培養液中グルコース濃度と乳酸濃度、溶存酸素、培養液回収間隔等に着目して、生理活性物質の最適化高生産培養法についての考察を行った。培地中グルコース濃度、培養液回収間隔等をパラメータ

として実験的検討を行い、グルコースの乳酸への転化率と生理活性物質生産速度との関係を解析した。その結果、生理活性物質の生産性を高めるための重要な指標を明らかにした。

3. 2 実験材料と実験方法

(実験材料)

基本合成培地としてDMEM(High glucose) (日本製薬)、T-medium (日本製薬) を用いた。血清は細胞増殖や目的物質の生産性について、ロット検査を行った牛胎児血清 (Fetal bovine serum : FBS) (Gibco社製) を用いた。T+ITES培地中の添加物としては、Daigo-ITES (日本製薬) を希釈して使用した。希釈後の培地中標準濃度は、それぞれインスリン：2.0mg/l、トランスフェリン：2.0mg/l、エタノールアミン：0.122mg/l、亜セレン酸ナトリウム：0.009mg/lである。

細胞は、CHO-K1細胞にプラスミドpRS7TM-neoを導入して形質転換を行った付着依存性CHO-K1-RS7TMneo-No.21細胞(CHO(21))を使用した⁶⁴⁾。T25型フラスコ(Corning社製)を用いて、T+10%FBS培地で2日～3日に一回培地交換しながら維持培養を行い、増殖が安定した細胞をそれぞれの実験に使用した。

マイクロキャリアは、多孔性ゼラチン質のCultiSpher-G (Percell Biolytica社製) を使用した。Ca²⁺、Mg²⁺を含まないリン酸緩衝液(PBS) (日本製薬) で膨潤した後、121℃で20分間滅菌し、さらに無菌PBSで洗浄したものをマイクロキャリア培養実験に使用した。

(培養方法)

T型フラスコによる静置培養はT25型フラスコを用いて行い、培養液仕込み量を5ml、細胞播種密度を 1×10^5 cells/mlとしてCO₂インキュベータ内 (5%CO₂、37℃) で実験を行った。培地交換は、1回目細胞を播種してから3日後、その後は2日に1回を基準とした。

マイクロキャリア培養実験は、3l-ミニジャーファーマンター(3LFM) (イワシヤ社製) を用いた。Fig.3-1に示すように、3LFM内には溶存酸素(DO)計、pHセンサー、温度コントロールユニット、培養液サンプリングシステム、培地流入口、培養液回収口、通気流入口及び排気口をそれぞれ装着した。3LFMを用いた実験では、Table 3-1に示すように、通気条件、培養初期の血清を用いる細胞増殖期間、培地中グルコース濃度、培養液回収間隔、等をパラメータとして実験を行った。培地仕込量は約1l、細胞播種密度は約 1×10^5 cells/ml、マイクロキャリア濃度は1g/l、攪拌速度は40rpm、通気条件は2.0l-ガス/min、或は0.1l-O₂/minの流速で上面通気法で実験を行った。2.0l-ガスの流量組成は、N₂を75%、O₂を20%、CO₂を5%としてガス流量調節器 (Kofloc GM-3A：小島製作所) で調節した。0.1l-O₂/minの場合は、オン・オフ流量調節器 (和研薬社製) で酸素流量を0.1l/minに調節し、自動制御器 (Able社製) でDO値を、純酸素で飽和するDO値の20%に設定して定値制御を行った。

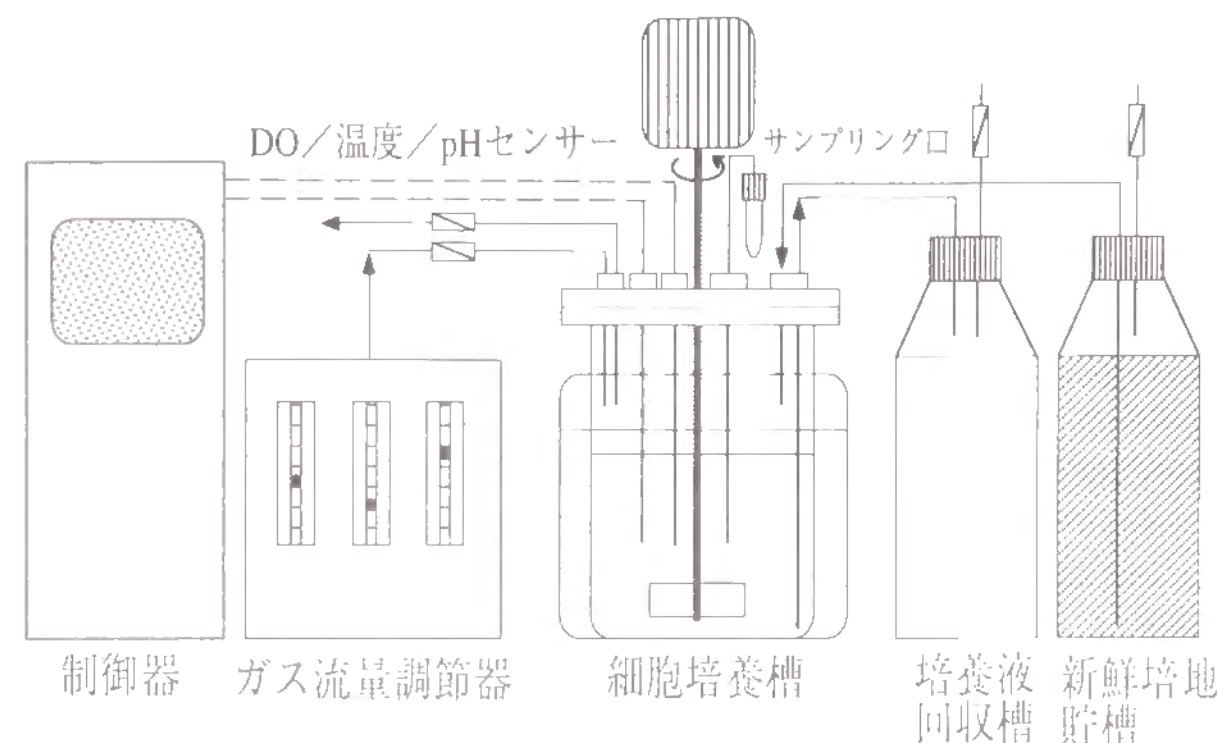


Fig.3-1 3l-ミニジャーファーマンター培養システムの概略図

Table 3-1 培養条件

| | 通気ガス | マイクロ キャリア濃度 [g/l] | 細胞増殖 期間 [day] | 細胞増殖期 の培地 | 培養液 回収間隔 [day] | 無血清 培地 | 新鮮培地中 グルコース濃度 [g/l] |
|-----|-----------------------|---------------------------|-----------------------|--------------|------------------------|-----------|-----------------------------|
| 実験A | Air+5%CO ₂ | 1 | 9 | DMEM+10%FBS | 2 | T+ITES | 3.15 |
| 実験B | pure O ₂ | 1 | 7 | T+5%FBS | 2 | T+ITES | 3.15 |
| 実験C | pure O ₂ | 1 | 5 | T+5%FBS | 3 | T+ITES | 6.15 |
| 実験D | pure O ₂ | 1 | 3 | T+5%FBS | 3 | T+ITES | 6.15 |

単回分培養は、一度培地を仕込んだら、培養中は培養液の抜き取りや新鮮培地の供給を一切行わない方法である。本研究では、その回分培養を繰り返して行う”繰返し回分培養法”を採用した。マイクロキャリア培養では、攪拌を停止させると細胞が付着したマイクロキャリアは培養槽の底面に沈降する。2日から3日間回分培養を行った後攪拌を停止し、沈降したマイクロキャリアと付着細胞は残して、浮遊した細胞を含む上澄み液だけを回収し、その後に新鮮培地を同量供給して培養を再開した。

この培地交換間隔は最初が3日後、その後は2日毎、或は3日毎とした。マイクロキャリア培養の利点は、培地交換が容易に行えるため回分培養を繰り返して行えるところである。また、繰返し回分培養の長所は、培地交換の際に細胞とマイクロキャリアを培養槽内に保持することができるため、再度細胞増殖の期間をとる必要がなく、さらに、マイクロキャリアの損失がないところである。

(測定方法)

T型フラスコを用いた静置培養実験では、上澄み液を回収し、YSI Model 2000 Glucose & Lactate Analyzer (YSI社製) でグルコース及び乳酸の濃度を測定した。上澄み液中のrsTM濃度は、サンドイッチ型ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法⁶⁴⁾によって測定した。細胞数の測定は、フラスコ底面に付着した細胞をトリプシン-EDTA溶液にて剥し、懸濁した後コールターカウンターで計測した。

3LFMを用いたマイクロキャリア培養では、細胞が付着したマイクロキャリアを含む培養液をサンプリング口から約3ml回収し、15ml遠沈管に移して3000rpm、10分間遠沈処理して細胞層と上澄み層に分離した。上澄み層のグルコース、乳酸、及びrsTM濃度の測定は、T型フラスコの場合と同様に行った。細胞数の計測は、細胞層をサンプリング時と同量のクリスタルバイオレット液(0.1M citric acid with 0.1% (w/w) crystal violet)に再懸濁し、37℃のCO₂インキュベータ内に1昼夜放置した後、放出された細胞核を顕微鏡下計測した²²⁾。死細胞由来の細胞核は着色の差によって区別し、主に生細胞由来の細胞核のみを計測した。

3. 3 実験結果と考察

3. 3. 1 繰返し回分マイクロキャリア培養系における酸素律速の影響

3L-ミニジャーファーマンター(3LFM)を用いたマイクロキャリア培養系にて、培養液中の溶存酸素の影響を検討した。酸素供給は2.0l/minの調節ガス(実験A)或は0.1l/minの純酸素(実験B)を上面通気法で行った。どちらの場合も酸素移動容量係数(k_La)値は、純水を用いて測定した結果、1.0 1/hで同じであった。調節ガスを用いた実験Aでは、DMEM+10%FBSを用いて9日間細胞増殖のための培養を行い、9日目に無血清化(T+ITES)して2日毎に培地交換を行った。一方、純酸素を用いた実験Bでは、T+5%FBSで7日間細胞増殖培養を行った後に無血清化(T+ITES)し、2日毎に培地交換を行った。どちらの実験もマイクロキャリア濃度を1g/lとした。細胞増殖のために用いた培地が異なっているが、CO₂インキュベータ内で行ったT型フラスコの実験によって、細胞増殖や到達細胞密度、rsTM生産性に関してその影響がないことを確かめた。

酸素移動速度は式(1)によって定義される⁷¹⁾。

$$d(DO)/dt = k_La \cdot (DO^* - DO) \quad (1)$$

ここで、DOは溶存酸素濃度、DO*は飽和溶存酸素濃度を表している。本実験系において純酸素を用いた場合(実験B)のDO*は、調節ガスを用いた場合(実験A)の5倍であり、一方、 k_La 値はどちらの場合も1.0 1/hと同じ値なので、酸素移動速度も純酸素の方がだいたい5倍の速度となる。その結果、実験Bでは設定値(純酸素飽和値の20%)付近を維持できたが、実験AでのDO値は0近辺まで下がり、設定値は維持できなかった。

どちらの通気方法を用いた実験でも、血清を用いた初期の細胞増殖期間では同じ増殖速度を示したが、無血清化した生産培養期間では、純酸素を用いた実験Bで6~9×10⁶cells/mlまで達したのに対し、調節ガスを用いた実験Aでは3~5×10⁶cells/mlまでしか到達せず、約2倍の開きが生じた(Fig.3-2a)。2. 3. 1で、グルコース律速条件下では到達細胞密度が小さくなることを論じたが、実験A、実験Bではグルコース律速にはなっていなかった。従って、実験Aの無血清化培養では酸素律速が到達細胞密度を低くしたのに対し、実験Bのような十分な酸素供給によって高密度培養が達成できたことを示している。実験Aの比乳酸生成速度は0.15~0.2mg/(10⁶cells·day)程度であったが、実験Bでは0.1mg/(10⁶cells·day)程度であった。即ち、ファーマンターを用いた培養においても、十分な酸素条件下では乳酸の生成が抑制されることが確認できた。

また、比rsTM生産速度は実験Bの方が若干高い値を示したものの、どちらの実験においても $2 \mu\text{g}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{day})$ 程度の値を示した(Fig.3-2b)。従って、純酸素を用いた方が、到達細胞密度が高い分だけ、体積当りのrsTM生産速度も高い値となった(Fig.3-2b)。

以上の結果より、高酸素条件下ではグルコースの代謝効率もよく、比rsTM生産速度にもよい影響を与え、特に細胞密度の差が、直接rsTMの培養液体積当りの生産速度 $[\text{mg}/(\text{l} \cdot \text{day})]$ に反映することになり、結果的に溶存酸素がrsTMの生産性に対しても大きな影響を持つことが明らかとなった。

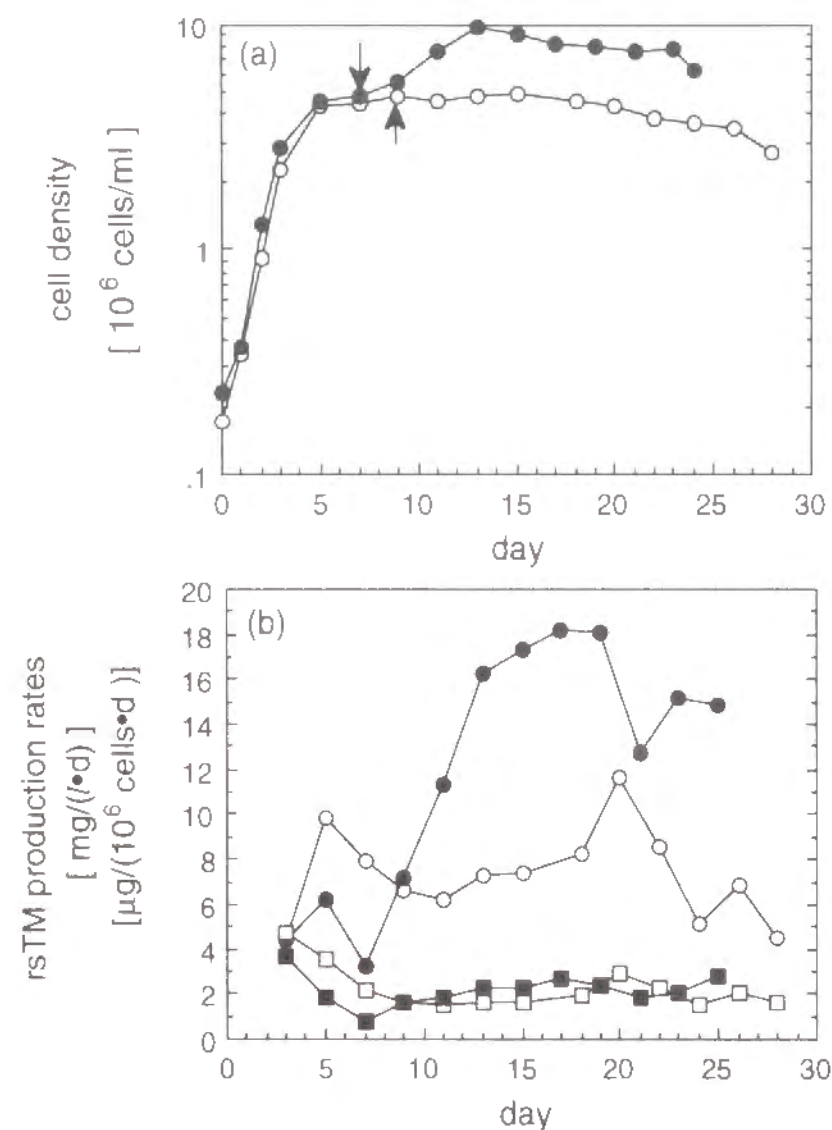


Fig.3-2 培養状態に及ぼす純酸素通気の影響

- (a) 細胞密度の経時変化 ○：実験A（調節ガス通気）
●：実験B（純酸素通気）
(b) rsTM生産速度 $[\text{mg}/(\text{l} \cdot \text{d})]$ の経時変化 ○：実験A、●：実験B
比rsTM生産速度 $[\mu\text{g}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})]$ の経時変化 □：実験A、■：実験B

3. 3. 2 新鮮培地中のグルコース濃度と培養液繰返し回収間隔の影響

前述の調節ガスを用いた実験Aでは、2日間の培養液回収期間に、だいたい培養液1l当り2gのグルコースが消費されたのに対し、酸素を用いた実験Bでは、約3gのグルコースが消費された。実験Bでは新鮮培地中に 3.15 g/l のグルコースが含まれており、グルコースは律速状態にはなっていないが、各バッチサイクル期間を延ばすとグルコース律速の状態になる可能性が高い。そこで、新鮮培地中に含まれるグルコース濃度を高めると同時に、各バッチサイクルの培養液回収間隔を延長することによって、繰返し回分培養の状態がどのような影響を受けるかを検討し、解析を加えた。実験Cでは、新鮮培地中のグルコース濃度を 6.15 g/l とし、培養液回週間隔を3日まで延長して実験を行った。通気方法として純酸素の上面通気 (0.1 l/min) を用い、T+5%FBSで5日間細胞増殖培養を行った後に無血清化(T+ITES)し、3日毎に培地交換を行った。

Fig.3-3には実験A～Cの比グルコース消費速度及び比乳酸生成速度の結果を示す。

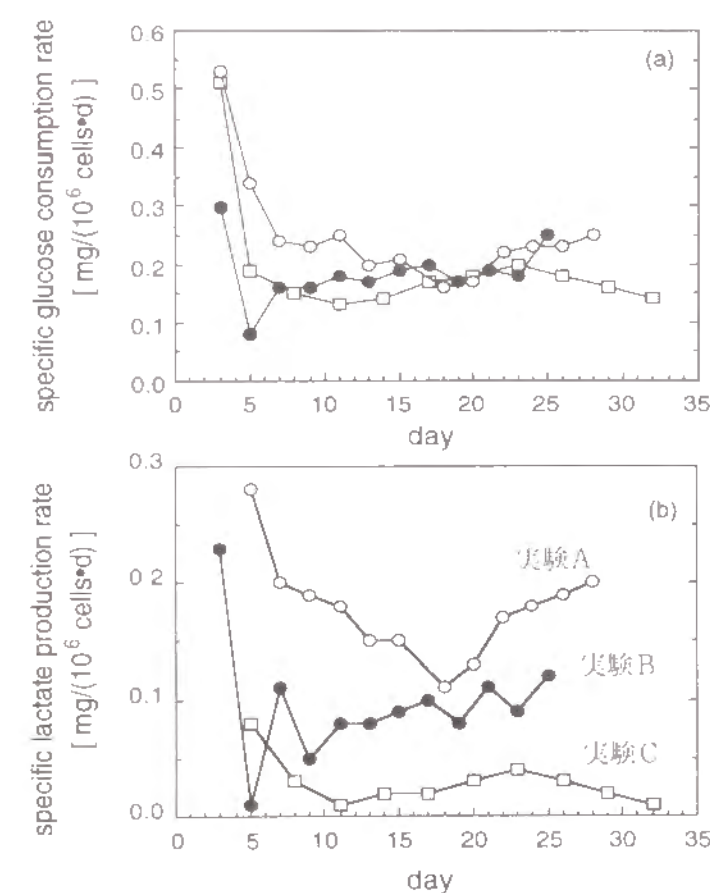


Fig.3-3 比グルコース消費速度と比乳酸生成速度に及ぼす培養条件の影響
(a) 比グルコース消費速度の経時変化、(b) 比乳酸生成速度の経時変化、
○：実験A（調節ガス通気、グルコース濃度 3.15 g/l ）、●：実験B（純酸素通気、
グルコース濃度 3.15 g/l ）、□：実験C（純酸素通気、グルコース濃度 6.15 g/l ）

比グルコース消費速度は、通気方法、新鮮培地中グルコース濃度、回収間隔、細胞密度等の培養条件及び培養状態の如何にかかわらず、ほぼ一定の値を示した(Fig.3-3a)が、比乳酸生成速度は大きく異なつた(Fig.3-3b)。Table 3-2に示すように、酸素律速が示唆される実験Aでは、消費されたグルコースの内、9バッチサイクルの平均で76%が乳酸に転化されているが、実験Bでは47% (9バッチサイクル)、実験Cでは約14% (10バッチサイクル)にとどまっている。グルコースの乳酸への転化率が高いことは、十分な酸素供給が行われていないことを意味している。酸素供給が充分であれば、代謝されたグルコースはTCAサイクルまで進み、水と二酸化炭素に分解される。その結果、グルコース当りのATP生成量が上がるため、高エネルギー効率によって細胞活性が高くなることが予想される。

実験Aと実験Bにおける比乳酸生成速度の違いは、通気条件の違いによって生じたことは明らかである。実験Bと実験Cは通気条件が全く同じであるにもかかわらず、実験Cの比乳酸生成速度の方がはるかに低い値を示している。実験Bと実験Cの条件の違いは、新鮮培地中グルコース濃度と培養液回収間隔の2つである。実験Cでは、3日間の各培養液回収サイクルにおいて、2日目までは乳酸生成とともに乳酸濃度が上がり、2日目から3日目にかけて乳酸濃度が低下した。即ち、一旦生成された乳酸が、再び細胞によって取り込まれて代謝された可能性がある。この現象が、培地中グルコース濃度を6.15g/lに上げたために生じたのか、回収サイクルの期間を延長したことによるのかを、T型フラスコによる実験で検証した。Table3-2に示すように、検証実験ではT+10%FBSを用いて4日間細胞増殖培養を行った後に、T+ITES培地と交換して無血清化培養を行った。新鮮培地中のグルコース濃度は3.15g/l、培養液回収間隔を1

日、2日、3日、4日として実験を行った。Table 3-2に結果を示すように、3.15g/lのグルコース濃度を用いたにもかかわらず、回収間隔が長い方が乳酸への転化率は低かった。この結果より、実験Cで乳酸への転化率が実験Bより低い値を示したのは、グルコース濃度を6.15g/lに上げたためではなく、培養液回収間隔を2日から3日に延長したためであると結論できる。また、T型フラスコによる実験で、回収間隔を長くするほど、到達細胞密度も低くなる傾向が認められたが、この結果も実験Bと実験Cの結果と一致している。

結論をまとめると、十分な酸素とグルコースの供給によって高密度培養が達成できる。また、繰返し回分の各バッチサイクルの培養間隔は、細胞の代謝効率に影響を与えている。即ち、その間隔が長いほど乳酸転化率を低く抑えて高エネルギー効率を獲得することができ、細胞活性を高く維持することが可能である。その効果として、生理活性物質の生産性が向上することが示唆された。一方、各バッチサイクルの培養間隔を長くすると、到達細胞密度が低くなることが静置培養実験で示唆されたため、rsTMの高い生産量を得るには、適切な培養間隔を選定することが重要である。

3. 3. 3 血清含有培地による培養初期の細胞増殖期間の検討

無血清化培養を行うためには、細胞を播種してから初期培養において、血清存在下で細胞を増殖させる必要がある。実験A、B、Cでは、血清含有培地を用いた細胞増殖期間は、それぞれ9日、7日、5日であった。そこで、高価な血清の使用量を削減するために、さらに細胞増殖期間を短縮することが可能かどうかを検討した。実験Dでは、細胞増殖期間を3日まで短縮して、5%FBS入り培地で培養を行った後、培地中血清を除去して、無血清化培養を行った。生産期としての無血清培養では、3日毎に培地交換を行った。使用したマイクロキャリア濃度は1g/l、細胞播種密度は約 3×10^6 cells/mlとした。実験Cと実験Dの培養液中の細胞密度の結果をFig.3-4aに示した。3日後に無血清化した実験Dでは、無血清化してから1日後には細胞はマイクロキャリアから剥離しはじめ、3日後(培養開始から6日後)には完全に剥離して(Fig.3-4b)、培地交換とともに細胞密度が低下した。一方、5日後に無血清化した実験Cでは、5日後には細胞はマイクロキャリア表面上で重層構造を形成し、無血清培地に交換した後もマイクロキャリアから剥離せず(Fig.3-4c)、無血清下の培養においても、わずかに増殖し細胞密度も増大した。即ち、無血清化するためには、ある一定期間血清を使用した培養が必要であることがわかった。5日程度血清存在下で培養すると、細胞密度は $4 \sim 5 \times 10^6$ cells/mlまで到達して、マイクロキャリア上で重層構造を形成するため、細胞間の結合がより強固なものになり、無血清培地中において付着を維持するこ

Table 3-2 各種培養状態に与える培養条件の影響

| | 通気ガス | 細胞増殖期培地 細胞増殖期間 | 無血清培地 培養液回収間隔 | 新鮮培地中 グルコース濃度 | 培養液 回収回数 | 平均乳酸転化率 ($\Delta L/\Delta G$ 比) | 平均細胞密度 [10^6 cells/ml] |
|-----------|-----------------------|-------------------|------------------|------------------|-------------|-------------------------------------|------------------------------|
| | | [day] | [day] | [g/l] | | [%] | |
| 実験A | Air+5%CO ₂ | DMEM+10%FBS 9 | T+ITES 2 | 3.15 | 9 | 76.2 | 4.09 |
| 実験B | pure O ₂ | T+5%FBS 7 | T+ITES 2 | 3.15 | 9 | 46.8 | 7.63 |
| 実験C | pure O ₂ | T+5%FBS 5 | T+ITES 3 | 6.15 | 18 | 13.6 | 6.22 |
| T-flask-1 | Air+5%CO ₂ | T+10%FBS 4 | T+ITES 1 | 3.15 | 10 | 73.1 | 6.76 |
| T-flask-2 | Air+5%CO ₂ | T+10%FBS 4 | T+ITES 2 | 3.15 | 6 | 56.5 | 4.88 |
| T-flask-3 | Air+5%CO ₂ | T+10%FBS 4 | T+ITES 3 | 3.15 | 4 | 41.3 | 4.51 |
| T-flask-4 | Air+5%CO ₂ | T+10%FBS 4 | T+ITES 4 | 3.15 | 3 | 26.2 | 3.41 |

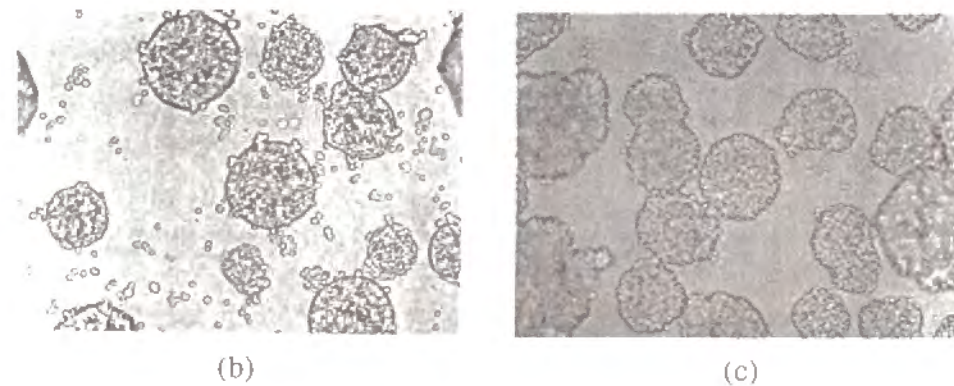
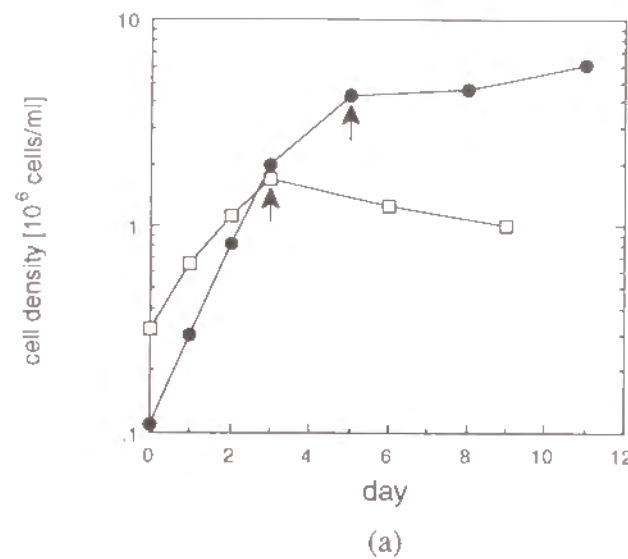


Fig.3-4 マイクロキャリア培養における血清使用期間の検討
 (a) 細胞密度の経時変化 ●：実験C（血清使用期間；5日間）
 □：実験D（血清使用期間；3日間）
 (b) 実験Dにおいて、無血清化してから3日後の細胞の状態
 (c) 実験Cにおいて、無血清化してから3日後の細胞の状態

とができるものと考えられる。

1g/lのマイクロキャリア濃度の培養液中には、約 $2\sim3\times10^6$ 個のマイクロキャリアが含まれている(Table 2-3)。この数を培養液1ml当りに換算すると、マイクロキャリア数は約 $2\sim3\times10^3$ 個/mlになる。即ち、実験Dでは3日後 (1.8×10^6 cells/ml) に無血清化した時点で、マイクロキャリア1個当たり $0.6\sim0.9\times10^3$ cells/carrierの細胞しか存在しないことになるが、実験Cでは5日後の細胞密度は 4.3×10^6 cells/mlなので、 $1.4\sim2.2\times10^3$ cells/carrierの細胞が存在していたことになる。従って、無血清培養を成功させるためには、マイクロキャリア1個当たり、約 1.4×10^3 個以上の細胞付着が必要であることを示唆している。1g/lという低いマイクロキャリア濃度は、コスト面からの効果とともに、初期の細胞増殖期に個々のマイクロキャリアに付着する細胞数の割合を向上させ、短期間（5日）で重層構造を形成し易くするという利点を合わせ持つことになる。

3. 3. 4 生理活性物質（トロンボモジュリン）の高生産培養

実験Bでは、2日間のサイクルにおいて3g/lのグルコースが消費された。そこで、実験Cで新鮮培地中のグルコースを6.15g/lに上げることによって、培養液回収サイクルを3日間に延長することができた。実験Bと実験Cでは通気条件は同じであり、かつグルコース律速になっていないにもかかわらず、実験Cの到達細胞密度は、Fig.3-5aに示すように $5\sim7\times10^6$ cells/mlであり、実験Bの $6\sim9\times10^6$ cells/mlよりも若干低かった。

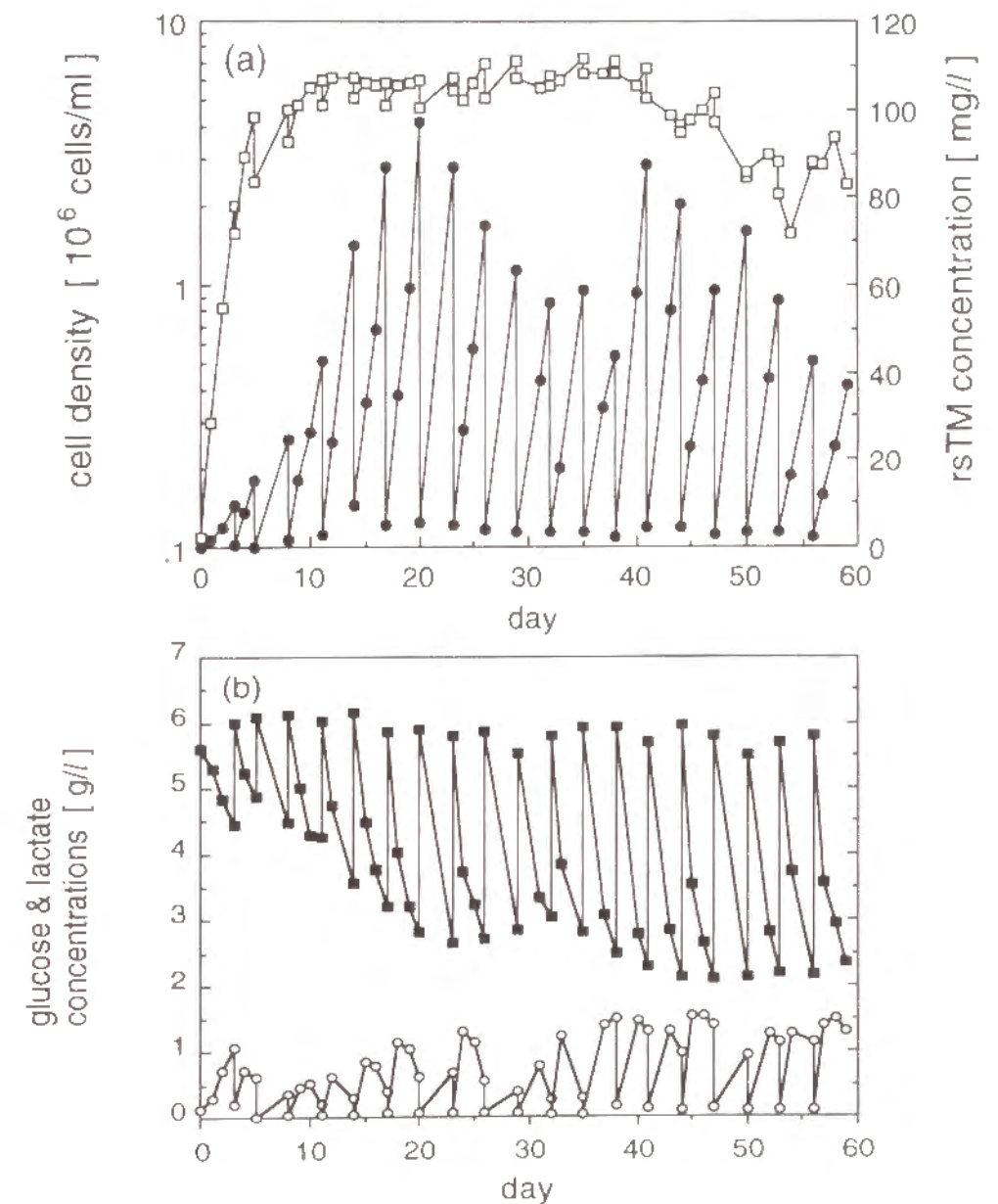


Fig.3-5 rsTM長期化高生産のための最適化培養（実験C）
 (a) 細胞密度（□）と培養液中rsTM濃度（●）の経時変化
 (b) 培養液中グルコース濃度（■）と乳酸濃度（○）の経時変化

実験Bと実験Cでは、無血清培地中のグルコース濃度が異なっていたため、その影響をT-flaskを用いた実験で検討した。実験は、T-medium+10%FBS培地で5日間細胞増殖を行い、引き続いて、グルコース濃度が3.15g/lと6.15g/lの2種類のT+ITES培地で無血清培養を行った。結果は、初期の細胞増殖速度及び無血清培養下での到達細胞密度ともに同様な傾向を示し、グルコース濃度の影響がないことが確認できた。さらに、Table 3-2に示すT-flaskの実験では、培養液回収間隔が長くなるほど到達細胞密度が低くなっている。以上の結果から、実験Cにおいて到達細胞密度が低くなったのは、培地交換サイクルを2日から3日に延ばしたためと結論できる。Fig.3-5bには、培養液中のグルコース濃度と乳酸濃度を示した。1バッチサイクル内でのグルコース消費量は約4g/lであり律速にはなっていない。一方、乳酸については、培養液回収時0.3～1.5g/lの濃度であり、かなり低くなっている。乳酸濃度の低下は、培養液中pH値の低下を抑制するため、培養条件を安定に維持する効果も果たしている。

Fig.3-6には培養液体積当りのrsTM生産速度[mg/(l・day)]を示す。培養20日目に30mg/(l・day)でピークとなり、その後38日目まで低下した。しかし、再び増大して、41日目に28mg/(l・day)まで復活して2度目のピークを迎えた。培養液当りのrsTM生産速度[mg/(l・day)]に関して、2つのピークが存在したことは、この長期間培養中に細胞集団の入れ替わり（ターンオーバー）が生じていたことを示唆している。

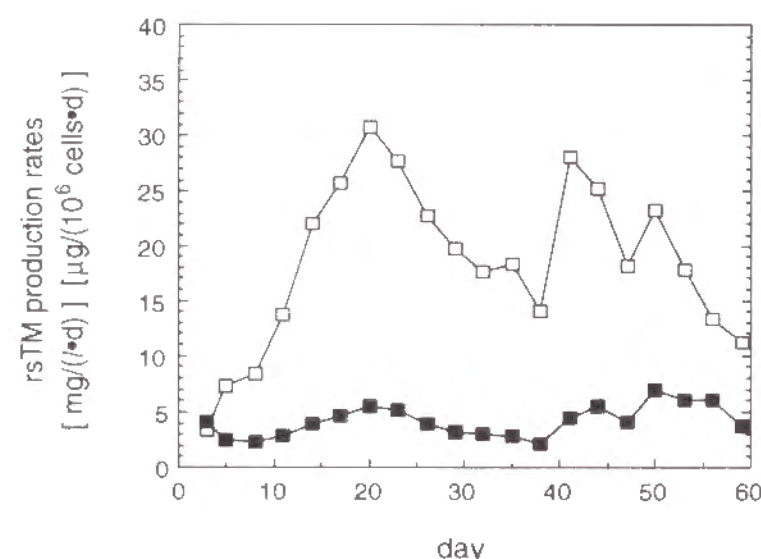


Fig.3-6 rsTM長期化高生産最適化培養（実験C）におけるrsTM生産性

□：rsTM生産速度[mg/(l・d)]の経時変化
■：比rsTM生産速度[μg/(10⁶cells・d)]の経時変化

実験Cの培養は約2ヶ月間継続でき、3日サイクルで18回培養液を回収した。培養液体積当りの平均rsTM生産速度は約20mg/(l・day)であり、18回の平均rsTM濃度は約63mg/l、最大rsTM濃度は97mg/lまで達した。この値は、1lの培養2ヶ月間で約1gの

タンパク質を生産したことになる。この結果は、マイクロキャリアによる浮遊培養系において初期細胞増殖期間の短期化（5日）、血清濃度の低減（5%）、無血清培地による培養、さらに培養液回収サイクル期間の延長による無血清培地使用量の低減、マイクロキャリア使用量の削減(1g/l)、純酸素通気による酸素使用量の低減(0.1l/min)、等々など種々の省コスト化戦略を十分に満足した条件下で達成できた。

ローボトルによる培養実験では、比rsTM生産速度は最大5μg/(10⁶cells・day)まで達したが、生産スケールの点において限界がある。本研究の実験A及び実験Bでは、だいたい2μg/(10⁶cells・day)程度の値までしか達しなかった(Fig.3-2b)が、実験Cの長期間培養においては、5～7μg/(10⁶cells・day)の値が得られた(Fig.3-6)。Fig.3-7は実験A、B、Cのグルコースの乳酸へのそれぞれの平均転化率（ΔL/ΔG）に対する、平均比rsTM生産速度の関係である。ΔL/ΔGの値が低いほど、比rsTM生産速度が増大している。3.3.1では十分な酸素の供給によって細胞密度を高く維持でき、その結果、rsTMの生産性も向上できることを示した。また、3.3.2では、十分な酸素の供給と各バッチサイクルの期間の延長によって、乳酸転化率（ΔL/ΔG比）を低く抑えて高エネルギー効率を獲得することができ、細胞活性を高く維持することが可能であることを示した。これらの結果を総合すると、ΔL/ΔG比を指標として、この値を低く抑えるように酸素供給やグルコース濃度、各バッチサイクルの間隔を操作することによって、単位細胞当りのrsTMの生産性を高めることが可能となる。

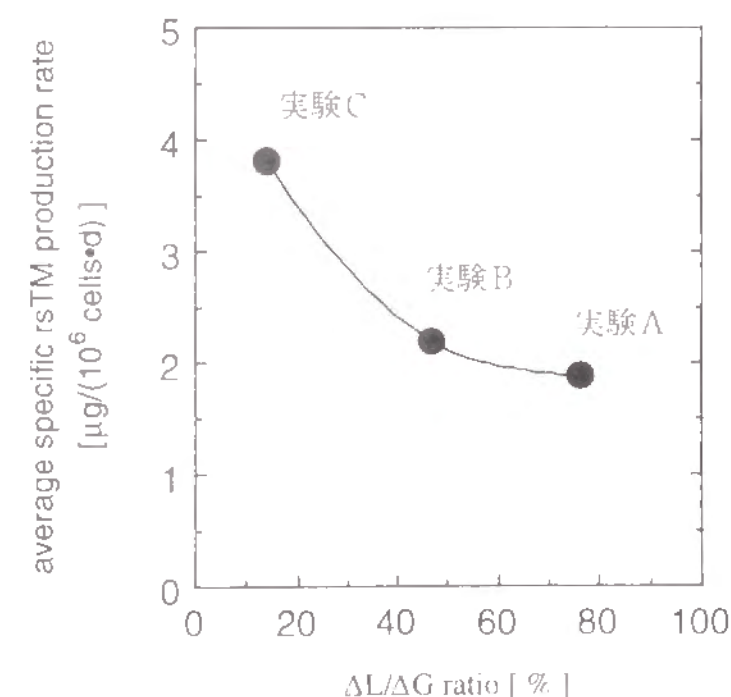


Fig.3-7 ΔL/ΔG比と比rsTM生産速度の相関関係

3. 4 結言

本章では、生理活性物質の最適化高生産培養法の確立を目的として、生物反応速度を指標にして解析を行った。その結果、生理活性物質の生産性を高めるためには、溶存酸素、グルコース濃度、培養液回収間隔が重要な操作変数であり、それらの結果であるグルコースの乳酸への転化率 ($\Delta L / \Delta G$ 比) が重要な状態変数であることを明らかにした。さらにそれらの結果をふまえ、長期的かつ高生産培養を達成した。

以上述べてきたように、ミージャーファーマンターを用いた繰返し回分マイクロキャリア培養系において、以下のことを明らかにした。

到達細胞密度を高く維持するためには、

- ①：十分なグルコースの供給によって、グルコース律速を生じさせないこと。
- ②：十分な酸素供給によって、酸素律速を生じさせないこと
- ③：培養液回収間隔を短くすることが重要である。

一方、生理活性物質の生産性を高めるためには、

- ①：前述したような細胞密度を高めるような培養条件を選定すること。
 - ②：十分なグルコースと酸素の供給と、適切な培養液回収間隔によって、 $\Delta L / \Delta G$ 比を低くするような条件を選定すること。
- が重要であることを明らかにした。

細胞密度を高めるために培養液回収間隔を短くすることと、 $\Delta L / \Delta G$ 比を下げて比rsTM生産速度を上げるために培養液回収間隔を長くすることは、同時には達成できないが、適切な細胞密度と $\Delta L / \Delta G$ 比によって、培養液体積当りのrsTM生産速度の最大値を導くことができた。本研究の繰返し回分培養形式による無血清マイクロキャリア培養系においては、3日間が最適な間隔であり、最大30mg/(l·day)、平均20mg/(l·day)を達成した。この結果は、種々の省コスト化戦略を十分に満足した培養条件下での値である。通気条件の一つである酸素移動容量係数(k_La)値は、本研究の3LFMの場合1.0 l/hであった。この値は大型のリアクターを用いた場合でも充分達成可能な値である。これらの結果を総合的に判断すると、スケールアップのための第一段階はクリアしており、工業化スケールでの生産を実現し得る結果である。

第3章の記号表

| | |
|-----------------------|----------------------|
| DO | : 溶存酸素濃度 |
| DO* | : 飽和溶存酸素濃度 |
| G | : 培養液中グルコース濃度 [g/l] |
| k_La | : 酸素移動容量係数 [l/h] |
| L | : 培養液中乳酸濃度 [g/l] |
| t | : 時間 [h] |
| $\Delta L / \Delta G$ | : 乳酸生成量・グルコース消費量 [%] |

第4章 糖鎖修飾型生理活性物質の選択的高生産培養法

4. 1 緒言

前章では、生理活性物質の生産性においては、溶存酸素、グルコース濃度、培養液回収間隔が重要因子であることを明らかにし、それらの変数を適切に操作することによりrsTMの高生産培養法を確立した。また、生理活性物質の生産性を高めるためには、グルコースの乳酸への転化率（ $\Delta L / \Delta G$ 比）が重要な状態変数であることを明らかにした。

本研究で用いた形質転換CHO-K1細胞(CHO(21))によって発現されたトロンボモジュリンには、O結合型糖鎖とN結合型糖鎖が付加することがわかっている^{59)・63)}。1章でも述べたように、遺伝子工学的手法によって生産されたトロンボモジュリンには、これらの糖鎖の他に、グリコサミノグリカン側鎖を付加したトロンボモジュリンと、付加しないものが混在していることが示された^{63・64)}。CHO(21)も両方のタイプを同時に発現することがわかっている⁶⁴⁾。CHO(21)によって発現されたトロンボモジュリンにおいては、コンドロイチン-4-硫酸によって構成されるグリコサミノグリカン側鎖を付加したものをrsTM β 体と呼び、側鎖のないものをrsTM α 体とした⁶⁴⁾。

従来の研究では、タンパク質にグリコサミノグリカン側鎖が付加していると細胞増殖に影響があるという報告はあるものの⁷²⁾、これら2種類の生産性について培養工学的にアプローチした例はない。グリコサミノグリカン側鎖を付加した場合と付加しない場合で、その生体内比活性に全く差がないのなら問題はないのだが、トロンボモジュリンではrsTM α 体に比べ、糖鎖を付加したrsTM β 体の方が、in vitro 及びin vivo の両方の実験系において高い比活性を持つことが示されている^{64~65)・73)}。従って、本トロンボモジュリンを医薬品として開発するためには、rsTM α 体以上にrsTM β 体の生産量比を高くすることが重要な課題となる。培地中に各種の添加物を加え、培地組成を変更する方法も試みたが、顕著な効果は認められなかった。

本章では、3章における実験A、B、Cの培養回収液中のrsTM α 体とrsTM β 体を、イオン交換クロマトグラフィーによって分離して生産量比を求めた。そして、3つの実験の各種培養条件の違いに着目して、rsTM α 体及びrsTM β 体の生産特性について生物反応速度を指標として解析を行った。実験条件の良否によって、rsTM α 体及びrsTM β 体の生産特性に顕著な差が認められたため、まず、それらの発現に対する溶存酸素の影響を考察した。

さらに比乳酸生成速度と比rsTM β 生産速度の間に相関関係が認められたため、比乳酸生成速度及び乳酸生成量／グルコース消費量（ $\Delta L / \Delta G$ 比）を指標として、rsTM

α 体及びrsTM β 体の生産特性について解析し考察を加えた。その結果、適切な培養条件を選定することによって、rsTM β 体の生産性を増大することが可能であることを明らかにした。

4. 2 実験材料と実験方法

(実験材料)

基本合成培地としてDMEM(High glucose) (日水製薬)、T-medium (日本製薬) を用いた。血清は細胞増殖や目的物質の生産性について、ロット検査を行った牛胎児血清 (Fetal bovine serum : FBS) (Gibco社製) を用いた。T+ITES培地中の添加物としては、Daigo-ITES (日本製薬) を希釈して使用した。希釈後の培地中標準濃度は、それぞれインスリン : 2.0mg/l、トランスフェリン : 2.0mg/l、エタノールアミン : 0.122mg/l、亜セレン酸ナトリウム : 0.009mg/lである。

細胞は、CHO-K1細胞にプラスミドpRS7TM-neoを導入して形質転換を行った付着依存性CHO-K1-RS7TMneo-No.21細胞(CHO(21))を使用した^{6,4)}。T25型フラスコ(Corning社製)を用いて、T+10%FBS培地で2日～3日に一回培地交換しながら維持培養を行い、増殖が安定した細胞をそれぞれの実験に使用した。

マイクロキャリアは、多孔性ゼラチン質のCultiSpher-G (Percell Biolytica社製) を使用した。Ca²⁺、Mg²⁺を含まないリン酸緩衝液(PBS) (日水製薬) で膨潤した後、121℃で20分間滅菌し、さらに無菌PBSで洗浄したものをマイクロキャリア培養実験に使用した。

(培養方法)

ローラーボトルによる培養は、R850型ローラーボトル (表面積 : 850cm²) を用いて行い、培養液仕込み量を170ml、細胞播種密度を約1×10⁵cells/mlとして37℃の調温室で実験を行った。ローラーの回転速度は0.5rpmとした。培地交換は、1回目が細胞を播種してから3日後、その後は2日に1回行った。

マイクロキャリア培養実験は、3章(Fig.3-1)で示したように3Lミニジャーフェーマンター(3LFM) (イワシヤ社製) を用いた。3LFM内には溶存酸素(DO)計、pHセンサー、温度コントロールユニット、培養液サンプリングシステム、培地流入口、培養液回収口、通気流入口及び排気口をそれぞれ装着した。培地仕込量は約1l、細胞播種密度は 約1×10⁵cells/ml、マイクロキャリア濃度は1g/l、攪拌速度は40rpm、通気条件は2.0l-ガス/min或は0.1l-O₂/minの流速で上面通気法として実験を行った。2.0l-ガス/minの流量組成は、N₂を75%、O₂を20%、CO₂を5%としてガス流量調節器 (Kofloc GM-3A : 小島製作所) で調節した。0.1l-O₂/minの場合は、オン・オフ流量調節器 (和研薬社製) で酸素流量を0.1l/minに調節し、自動制御器 (Able社製) でDO値を、純酸素で飽和するDO値の20%に設定して定値制御を行った。

培地交換時は攪拌を停止し、細胞の付着したマイクロキャリアが充分沈降した後、浮遊した細胞を含む上澄み液だけを回収し、その後に新鮮培地を同量供給した。培地交換間隔は最初が3日後、その後は2日毎 (実験A、実験B)、或は3日毎 (実験C) とした。

(測定方法)

3LFMを用いたマイクロキャリア培養では、細胞が付着したマイクロキャリアを含む培養液をサンプリング口から約3ml回収し、15ml遠沈管に移して3000rpm、10分間遠沈処理して細胞層と上澄み層に分離した。上澄み層のグルコース、乳酸の濃度は、YSI Model 2000 Glucose & Lactate Analyzer (YSI社製) で測定した。rsTM濃度はサンドイッチ型ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法^{6,4)}によって測定した。細胞数の計測は、細胞層をサンプリング時と同量のクリスタルバイオレット液(0.1M citric acid with 0.1% (w/w) crystal violet)に再懸濁し、37℃のCO₂インキュベータ内に1昼夜放置した後、放出された細胞核を顕微鏡下計測した^{2,2)}。死細胞由来の細胞核は着色の差によって区別し、主に生細胞由来の細胞核のみを計測した。

(rsTM α とrsTM β の分離)

回収した培養液を遠心器にかけ、浮遊懸濁している細胞及び浮遊物を除去した後、平均孔径が2 μ mのフィルターに通した。10N NaOHでpH7.5に調整後、0.15MNaCl-(0.02MTris-HCl)溶液(pH7.5)で平衡化したQ-Sepharose Fast Flow (Pharmacia-LKB) カラム(ϕ 2.5cm×12cm)に、試料を100～300ml流した。吸着操作の後、同じバッファーでカラムを洗浄し、NaClの濃度勾配(0.15MNaCl～1.2MNaCl in 0.02MTris-HCl,pH7.5)によって溶出し、5ml/fractionで分画した。溶出液は吸光度280nmの波長でモニターし、rsTM α とrsTM β を含む各フラクションを別々に回収して、ELISA法によってそれぞれの濃度を測定した。

4. 3 実験結果と考察

4. 3. 1 糖鎖修飾型生理活性物質生産に及ぼす溶存酸素の影響

培養液中に分泌されたrsTMを、Fig.4-1に示すようにイオン交換クロマトグラフィーによって精製した。溶出はNaClの濃度勾配(0.15~1.2M)によって行った。rsTM α は0.35M NaClの位置にシャープなピークとして溶出され、rsTM β はNaClの高濃度の位置にブロードなピークとして溶出された。rsTM β の溶出位置がNaClの高濃度側にシフトしたのは、rsTM β 体にはマイナスにチャージしたグリコサミノグリカン側鎖が付加しているためであり、またピークがブロードになったのは、この側鎖の構成単位である基本二糖のコンドロイチン-4-硫酸の構成数に10から数十まで分布があるためである⁷⁴⁾。各培養液中のrsTM α 体とrsTM β 体の含有量は、両ピークの各フラクションをまとめて、その体積と濃度から算出した。

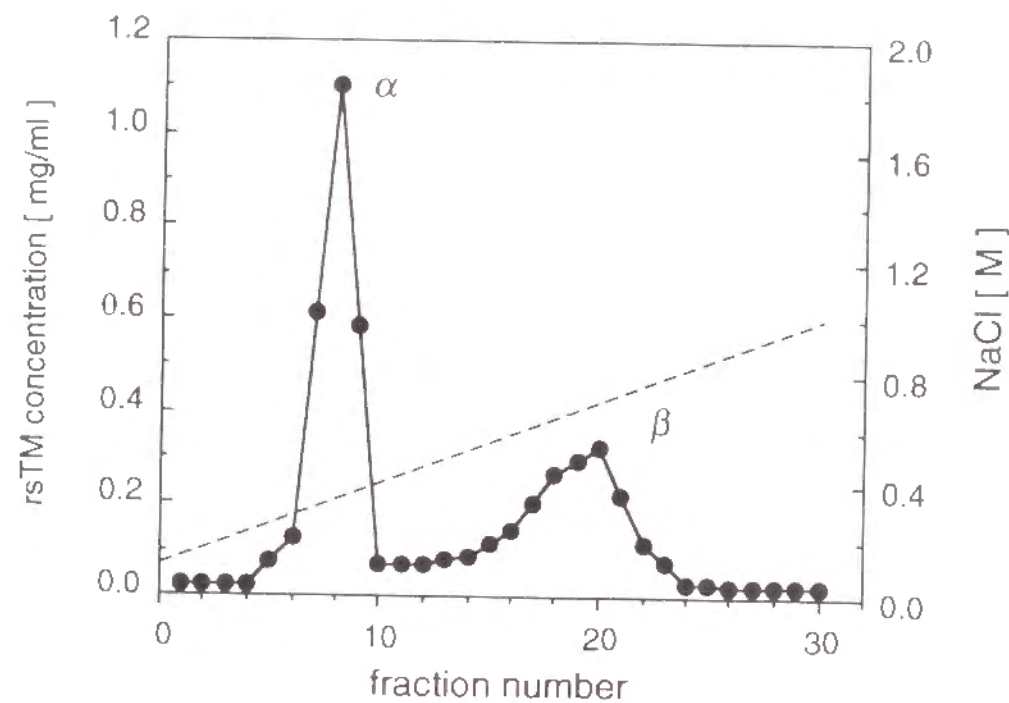


Fig.4-1 培養液中rsTM α およびrsTM β のイオン交換クロマトグラフィー
●：各フラクション中のrsTM濃度、-----：溶出液中NaCl濃度

実験A、実験B、実験C（培養条件はp31のTable 3-1を参照）の各培養回収液中のrsTM α 体とrsTM β 体の含有比率（ β/α 比）の結果をFig.4-2に示した。同一実験においても各バッチサイクルによって β/α 比はバラついており、一定値を示さず不安定であることがわかった。即ち、何らかの培養条件の差が、 β/α 比に影響を与えていることを示唆している。実験Bにおける β/α 比は1.5付近で高い値を示したのに対し、実験Aでは0.5以下の低い値となった。実験Bと実験Cでは純酸素を用いて酸素供給が充分に行われたが、実験Aでは通気方法として調節ガスを用いたため酸素供給が充分でなかったことを前の章で論じた。その他、これらの実験の設定条件としては、血清を用いた培養初期の細胞増殖期間、新鮮培地中のグルコース濃度や培養液回収期間等が異なっている。また、初期の細胞増殖期に用いた培地組成(DMEM or T-medium)及び血清濃度(10% or 5%)が異なっているため、ローラーボトルを用いた実験でその影響を検討した。初期培地としてDMEM+10%FBSとT-medium+10%FBSを用いて細胞増殖を行い、引続きT+ITES培地で無血清培養を行った。培養液回収は2日毎に行い新鮮培地と交換した。結果は、初期培地としてDMEM+10%FBSを用いた場合の8回の回収培養液の平均 β/α 比の値が1.1、T-medium+10%FBSの7回の平均値が1.0であった。従って、培養初期の基本合成培地組成は、その後の無血清培養における β/α 比には殆ど影響しないことが確認できた。

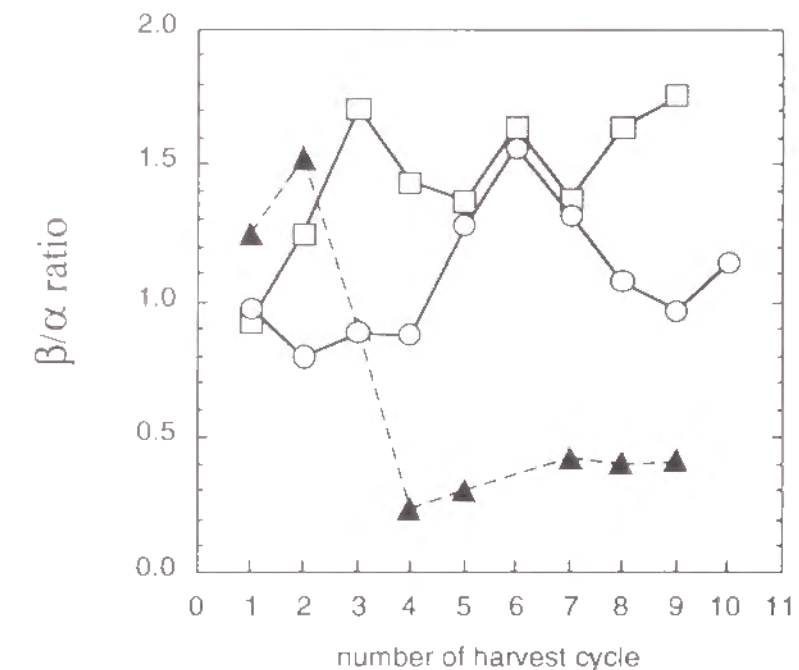


Fig.4-2 3LFBMを用いた培養実験の各バッチサイクルの β/α 比率
▲：実験A（調節ガス、DMEM+10%FBS、G=3.15g/l、2日サイクル）
□：実験B（純酸素、T+5%FBS、G=3.15g/l、2日サイクル）
○：実験C（純酸素、T+5%FBS、G=6.15g/l、3日サイクル）

比rsTM生産速度に対して、rsTM α 及びrsTM β の比生産速度の値をFig.4-3に示した。rsTM α 及びrsTM β の比生産速度ともに比例関係が認められたが、どちらの場合も二つの傾向がある。純酸素を用いた実験Bと実験Cの値は一本の直線上にあり同様の傾向を示したが、調節ガスを用いた実験Aでは、rsTM α 及びrsTM β ともに比例関係は認められるものの、その傾きが大きく異なっている。実験Aの比rsTM β 生産速度は実験B、Cの値よりもかなり低く、その結果、実験Aの比rsTM α 生産速度は高い値となっている。従って、実験AのrsTM α 、rsTM β の生産特性は、実験B、Cのそれらの生産特性とは明らかに異なっている。以上の結果より、 β/α 比に対しては培養液中の酸素が最も重要な因子になっており、rsTM α の生産量に対してrsTM β の生産量 (β/α 比) を上げるためには、十分な酸素の供給によって、酸素律速を生じさせないことが重要であることが明らかとなった。

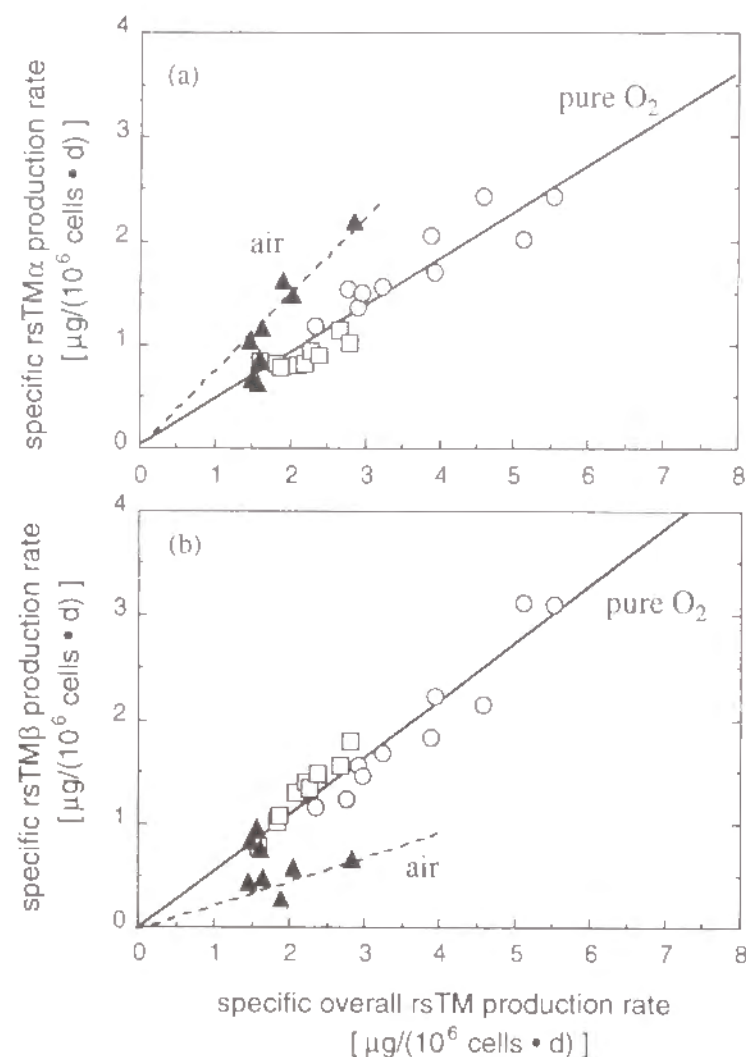


Fig.4-3 3LFMを用いた培養実験の各バッチサイクル毎の比rsTM α

および比rsTM β 生産速度に与える通気条件の影響

比rsTM生産速度に対する比rsTM α 生産速度(a)と比rsTM β 生産速度(b)の関係

▲：実験A（調節ガス）、□：実験B（純酸素）、○：実験C（純酸素）

4. 3. 2 糖鎖修飾型生理活性物質の高生産培養法

前章で論じたように、比グルコース消費速度は三つの実験（実験A、B、C）において0.2mg/(10⁶cells•day)程度で一定(Fig.3-3a)であったため、比rsTM α 生産速度及び比rsTM β 生産速度には相関関係がないことになる。一方、各実験のそれぞれのバッチサイクルにおける比乳酸生成速度の結果と、比rsTM β 生産速度の結果をFig.4-4に示した。この結果は、比乳酸生成速度の値がより低いほど、比rsTM β 生産速度はより高い値を示しており、関係が逆転している。

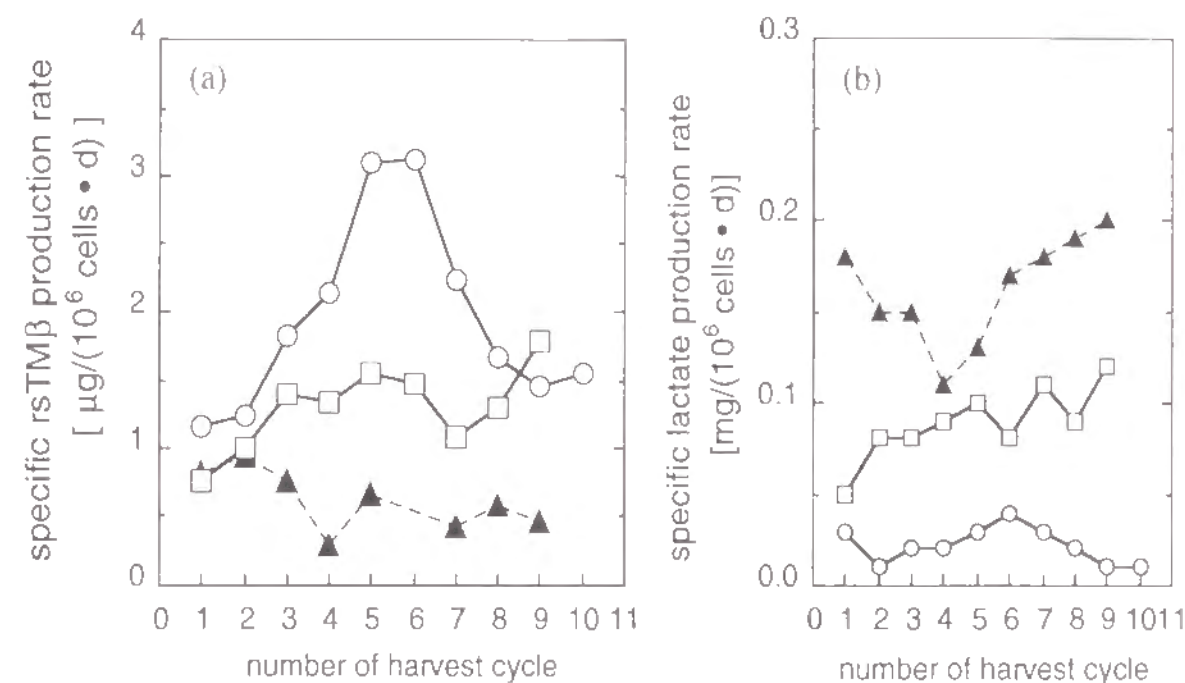


Fig.4-4 比rsTM β 生産速度と比乳酸生成速度の相関関係

各回収サイクルの比rsTM β 生産速度(a)と比乳酸生成速度(b)

▲：実験A（調節ガス、G=3.15g/l、2日サイクル）、□：実験B（純酸素、G=3.15g/l、2日サイクル）、○：実験C（純酸素、G=6.15g/l、3日サイクル）

3章では、 $\Delta L/\Delta G$ 比が培養状態の良否とrsTMの生産性を判断するための指標になることを示した。Fig.4-4で示したように、乳酸の生成とrsTM β の生産性の間に相関があるということは、rsTM β の生産性と $\Delta L/\Delta G$ 比の間にも何らかの相関関係があることを示唆している。Fig.4-5には、 $\Delta L/\Delta G$ 比に対して、各実験の各バッチサイクル毎の比rsTM α 生産速度(a)、比rsTM β 生産速度(b)、及び細胞密度も考慮した培養液体積当りのrsTM β 生産速度(c)の値を示した。

Fig.4-5bは、比rsTM β 生産速度が、 $\Delta L/\Delta G$ 比が低いほど増大する傾向があることを示している。 $\Delta L/\Delta G$ 比が80%から40%の範囲でのこの傾向は、実験Aと実験B

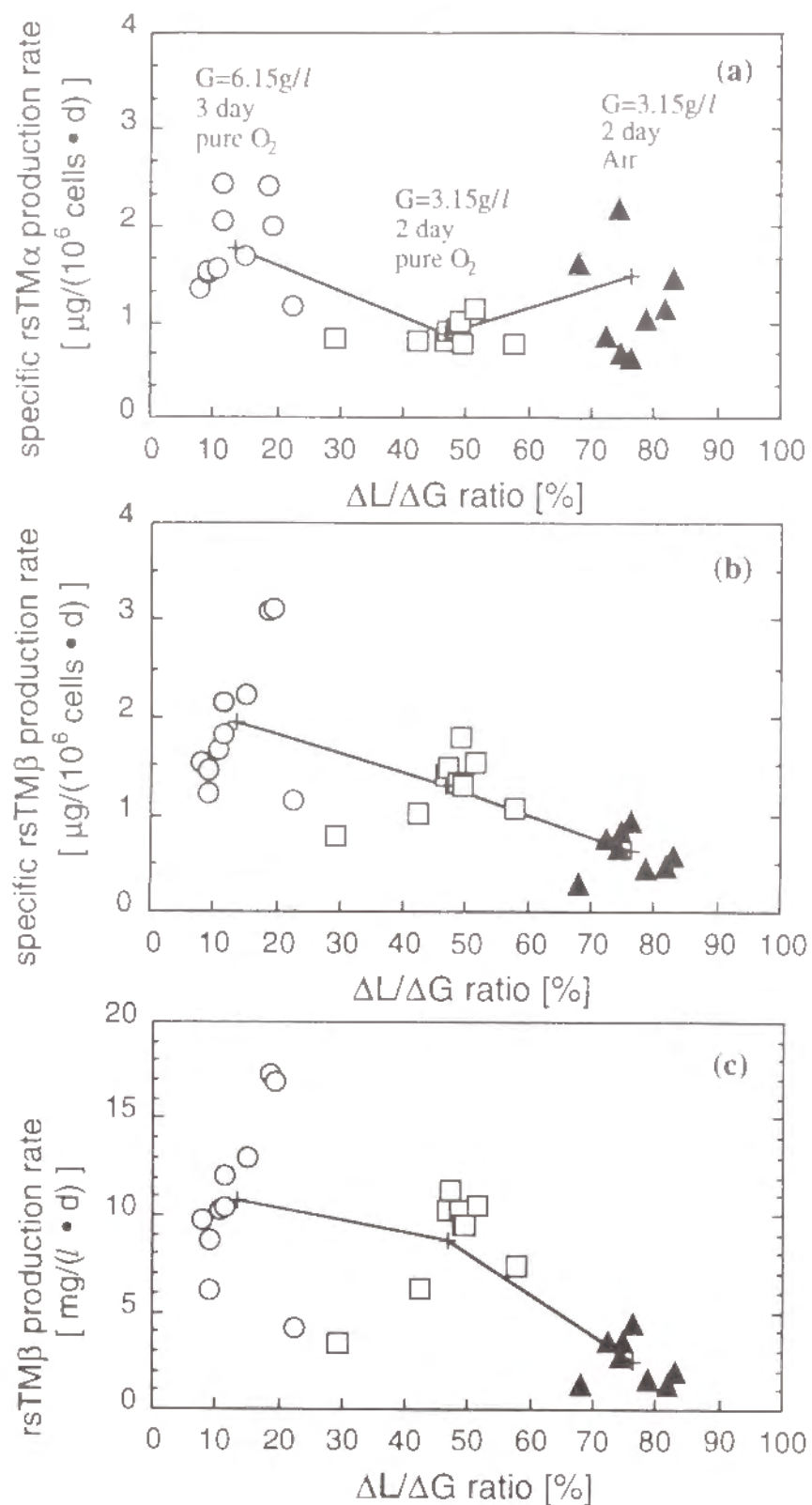


Fig.4-5 $\Delta L / \Delta G$ 比と rsTM α および rsTM β 生産性の相関関係

- (a) 比rsTM α 生産速度の $\Delta L / \Delta G$ 比依存性
- (b) 比rsTM β 生産速度の $\Delta L / \Delta G$ 比依存性
- (c) 培養液体積当り rsTM β 生産速度[mg/(l · d)]の $\Delta L / \Delta G$ 比依存性

▲：実験A、□：実験B、○：実験C、+：各実験毎の平均値

に起因している。実験A（純酸素）と実験B（調節ガス）の大きな違いは酸素の供給方法なので、Fig.4-3の結果と一致している。 $\Delta L / \Delta G$ 比が50%から10%の範囲での、比rsTM β 生産速度の傾向は、実験Bと実験Cの培養条件の差に起因している。実験Bと実験Cの違いは、新鮮培地中のグルコース濃度と培養液回収間隔であった。3章では、通気方法ばかりではなく、培養液回収間隔も $\Delta L / \Delta G$ 比に影響を与えることを論じた。即ち、Fig.4-5bの結果は、比rsTM β 生産速度についても $\Delta L / \Delta G$ 比を指標とすることが可能であり、酸素の条件ばかりではなく、培養液回収間隔を操作することによっても比rsTM β 生産速度を高めることが可能であることを意味している。Fig.4-5aには、比rsTM α 生産速度を示した。比rsTM α 生産速度については $\Delta L / \Delta G$ 比との相関性はなく、比rsTM生産速度及び比rsTM β 生産速度に依存して上下していると考えるほうが妥当である。

培養液回収間隔を延長すると、到達細胞密度が低くなる傾向があることを前章にて示したように、実験Cの到達細胞密度は実験Bの値よりも低かった。従って、rsTM β の生産性を論じる場合には、比rsTM β 生産速度ばかりではなく、細胞密度も考慮した培養液体積当りのrsTM β 生産速度[mg/(l · day)]についても考察する必要がある。その結果をFig.4-5cに示したが、やはり $\Delta L / \Delta G$ 比が低い方が、培養液体積当りのrsTM β 生産速度は高い値を示している。即ち、これらの結果より、 $\Delta L / \Delta G$ 比を低くするような培養条件によって、rsTM β の生産性の向上が可能であると結論できる。

培養液体積当りの総rsTM生産速度[mg/(l · day)]と、rsTM β 生産速度との相関関係を検討した結果がFig.4-6である。rsTM β 生産速度は、総rsTM生産速度に対して直線関係にあり飽和曲線にはなっていない。即ち、rsTM生産過程において、グリコサミノグリカン側鎖の修飾付加が、rsTMの生産速度の増大によって限界がないことを意味している。さらに、直線関係にあることは、rsTMの生産速度に比例して、コンドロイチン-4-硫酸の合成が進行し、側鎖として付加されることを示唆している。総rsTM生産速度が12mg/(l · day)以下の場合には、rsTM β 生産速度もrsTM α 生産速度に比較して低くなっているが、総rsTM生産速度が12mg/(l · day)以上の高いレベルにおいては、相対的にrsTM β 生産速度も高くなっている。つまり、総rsTM生産速度が12mg/(l · day)以上の範囲では、rsTM β の高生産性及び高い β / α 比が期待できることが明らかとなった。

3章では、総rsTMの生産性を高く維持するためには、十分なグルコースと酸素の供給によって到達細胞密度を高め、適切な培養液回収間隔によって $\Delta L / \Delta G$ 比を低く維持するような培養条件が重要であることを明らかにした。本章でのrsTM β の生産性についても、十分な酸素の供給と $\Delta L / \Delta G$ 比を低く維持することが重要であることを明らかにすることができた。繰返し回分培養系での培養液回収間隔は連続培養系での希釈率に相当しており、連続系においても十分な酸素の供給と最適な希釈率の選定

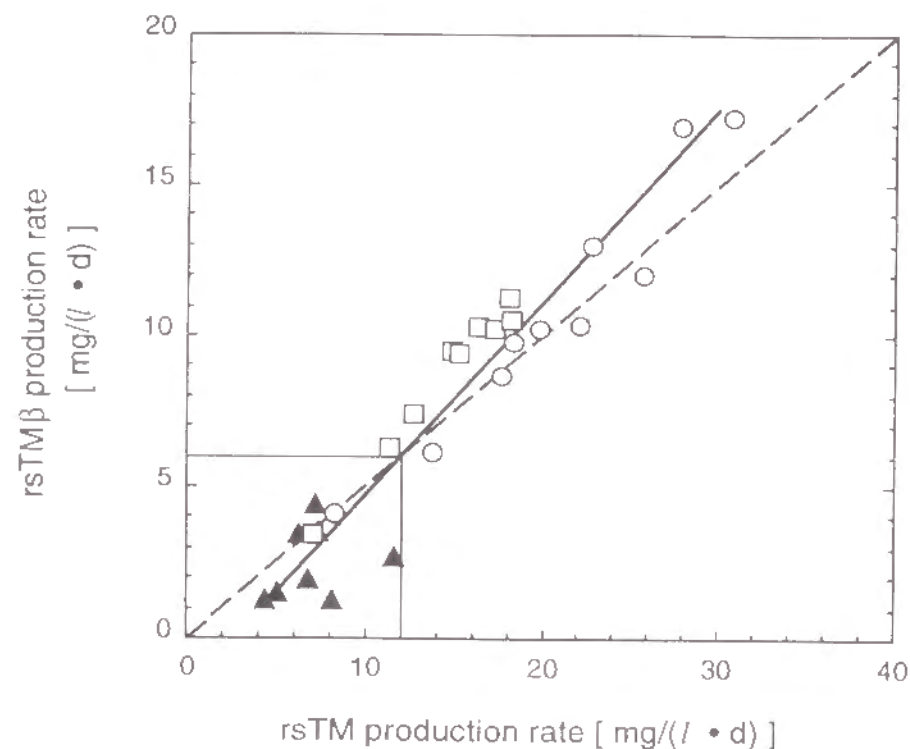


Fig.4-6 培養液体積当りrsTM生産速度[$\text{mg}/(\text{l} \cdot \text{d})$]とrsTM β 生産速度[$\text{mg}/(\text{l} \cdot \text{d})$]の相関関係

- ▲：実験A（調節ガス、2日サイクル）
 - ：実験B（純酸素、2日サイクル）
 - ：実験C（純酸素、3日サイクル）
- 直線は最小二乗法によって求めた。

によって、総rsTM生産速度とrsTM β 生産速度の向上が可能であることを示唆している。結論としては、これらの重要因子を満足する培養条件によって、総rsTM生産性とrsTM β 生産性を矛盾なく高める方法が確立できた。

4. 4 結言

バイオテクノロジーを利用した医薬品の場合は、タンパク質を構成するアミノ酸配列ばかりではなく、タンパク質に付加する糖鎖が活性に関与し重要な役割を持っている場合が多々ある⁷⁵。本研究で取り扱ったトロンボモジュリンも、糖鎖の構造によって活性に大きな開きが生じることは既に1章で論じた^{64, 65}。工業的生産面では、生産性が重要な課題であることはまちがいないが、糖タンパク質の場合は品質面としてその構造もさらに重要になってくる。本章では、培養工学的な手法によって糖鎖を含めたタンパク質の生産性を制御する方策を明らかにすることができた。

第一に、グリコサミノグリカン側鎖が付加したトロンボモジュリン（rsTM β ）の生産性を高めるためには、培養液中の溶存酸素が最も重要な因子になっており、十分な酸素の供給によって、酸素律速を生じさせないことが重要であることを明らかにした。

第二に、比rsTM β 生産速度、並びに培養液体積当りのrsTM β 生産速度についても $\Delta L / \Delta G$ 比を指標とすることができ、この値を低くするような培養条件によって、rsTM β の生産性を向上させることが可能であることを明らかにした。操作条件としては、溶存酸素ばかりではなく、培養液回収バッチサイクルの期間があげられる。

タンパク質だけではなく、糖鎖をも考慮して工学的に生産方法を検討した意義は非常に大きいものと考えている。本章では、糖鎖を付加したタンパク質の生産性を、選択的にコントロールすることが可能であることを示すことができた。将来的にも、糖タンパク質が医薬品として開発される可能性は極めて高い。従って、選択的に糖タンパク質の生産性を制御するばかりではなく、その構造をもコントロールするような要求が出てくるものと思われる。本研究によって、そのための先鞭をつけることができた。

第4章の記号表

| | |
|---------------------|---|
| G | : 培養液中グルコース濃度 [g/l] |
| L | : 培養液中乳酸濃度 [g/l] |
| β/α 比 | : rSTM_{β} 生産量 / rSTM_{α} 生産量の比率 [%] |
| $\Delta L/\Delta G$ | : 乳酸生成量 / グルコース消費量 [%] |

第2編

生物反応速度を利用した

培養状態推定法の開発

第5章 繰返し回分培養系における細胞密度 及び生理活性物質生産速度推定法の開発

5. 1 緒言

3章では、グルコースの乳酸への転化率 ($\Delta L / \Delta G$ 比) が重要な状態変数であり、この値を小さくすることによってトロンボモジュリン(rsTM)の生産性が向上することを明らかにした。また、同じく3章において、比グルコース消費速度の値は、実験条件にあまり左右されず一定の値を取ることを示した。さらに4章では、総rsTM生産速度とrsTM β 生産速度の間には、直線関係があることを明らかにした。本章ではこれらの関係を定式化することによって、工学的に応用することを試みた。

本研究のマイクロキャリアを用いた動物細胞培養の実験では、マイクロキャリア上に細胞が強固に付着するため、トリプシンによる普通の酵素処理法では細胞がバラバラにならず、細胞数を正確に測定することができない。従って、核カウント法によって細胞数を計測している。しかし、核カウント法ではサンプリングから実際の計数までのタイムラグが長いため、進行中の実験についてはリアルタイムで細胞数を把握することができない。また、タンパク質量や濃度の定量にはELISA法が常套手段であるが、定量精度を高めるためには実験者の熟練とノウハウの蓄積が必要であり、実験誤差の心配は払拭されない。さらに細胞数計測と同様、サンプリングから実際の測定までのタイムラグがやはり長い。rsTM α 体とrsTM β 体の生産量を把握するためには、4章でも示したように精製工程を経なければならないため、さらにタイムラグは長くなる。これらの状態量を直接計測する方法が不可能ならば、リアルタイムで測定可能な別の状態量から間接的に求める手段をとる必要がある^{31)~32)}。

動物細胞培養系において、上記に示すような関係を制御系などに工学的に応用するためには、諸々の因果関係を解析し数式化しなければならない³¹⁾。最近では定量的数式化よりも経験則に大きく依存するファジー理論なども生物反応系に応用されるようになったが、研究例はまだ少ない^{76~77)}。本章では、まず繰返し回分培養系の実験データを詳細に検討することによって、これらの因果関係のモデリングを行うことから始めた。細胞数とグルコース消費速度の相関関係、並びにrsTM生産速度と $\Delta L / \Delta G$ 比の相関関係を定量化することによって、比グルコース消費速度及び比rsTM生産速度を表すモデル式を導出した。

これらのモデル式と物質収支式を用いて、培養液中のグルコース、乳酸の濃度測定を利用して、細胞数、rsTM生産速度、さらにはrsTM α 体とrsTM β 体の生産量比を推

定する方法を開発した。幸いにも、グルコースと乳酸の濃度の分析測定技術は進歩しており、かつオンラインでの計測技術も確立されているので²⁶⁾、制御系構築という意味においても発展性は大きい。推定アルゴリズムは、グルコース消費速度から細胞密度を推定するステップ、 $\Delta L / \Delta G$ 比から比rsTM生産速度を推定し、細胞密度と比rsTM生産速度の推定値を用いてrsTMの生産速度及び培養液中濃度を導出するステップ、及びrsTM生産速度からrsTM β 体とrsTM α 体の生産速度を推定するステップによって構成される。本章では、繰返し回分培養系において、実験A、B、Cとは異なる条件で実験を行い、この実験に対して推定法の実用性評価を行った。その結果、推定アルゴリズムの適用範囲を把握することができた。

5. 2 実験材料と実験方法

(実験材料)

基本合成培地は、T-medium (日本製薬) を用いた。血清は細胞増殖や目的物質の生産性について、ロット検査を行った牛胎児血清(Fetal bovine serum: FBS) (Gibco社製) を用いた。T+ITES培地中の添加物としては、Daigo-ITES (日本製薬) を希釈して使用した。希釈後の培地中標準濃度は、それぞれインスリン: 2.0mg/l、トランスフェリン: 2.0mg/l、エタノールアミン: 0.122mg/l、亜セレン酸ナトリウム: 0.009mg/lである。

細胞は、CHO-K1細胞にプラスミドpRS7TM-neoを導入して形質転換を行った付着依存性CHO-K1-RS7TMneo-No.21細胞(CHO(21))を使用した^{6,4)}。T25型フラスコ(Corning社製)を用いて、T+10%FBS培地で2日～3日に一回培地交換しながら維持培養を行い、増殖が安定した細胞をそれぞれの実験に使用した。

マイクロキャリアは、多孔性ゼラチン質のCultiSpher-G (PerCELL Biolytica社製) を使用した。Ca²⁺、Mg²⁺を含まないリン酸緩衝液(PBS) (白水製薬) で膨潤した後、121℃で20分間滅菌し、さらに無菌PBSで洗浄したものをマイクロキャリア培養実験に使用した。

(培養方法)

マイクロキャリア培養実験は、3L-ミニジャーファーマンター(3LFM) (イワシヤ社製) を用いた。3LFM内には溶存酸素(DO)計、pHセンサー、温度コントロールユニット、培養液サンプリングシステム、培地流入口、培養液回収口、通気流入口及び排気口をそれぞれ装着した。培地仕込量は約1L、細胞播種密度は 1×10^5 cells/ml、マイクロキャリア濃度は1g/l、攪拌速度は40rpmで実験を行った。通気条件は上面通気法を用い、オン・オフ流量調節器 (和研薬社製) で酸素流量を0.1l/minに調節し、自動制御器 (Able社製) でDO値を、純酸素で飽和するDO値の20%に設定して定値制御を行った。培地交換時は攪拌を停止し、細胞の付着したマイクロキャリアが充分沈降した後、浮遊した細胞を含む上澄み液だけを回収し、その後に新鮮培地を同量供給した。培養は、初めの6日間は2.5%FBS入りT-mediumを用いて細胞増殖を行い、6日目以降はT+ITES培地を使用して無血清培養を行った。培地交換間隔は3日毎とした。

(測定方法)

3LFMを用いたマイクロキャリア培養では、細胞が付着したマイクロキャリアを含む培養液をサンプリング口から約3ml回収し、15ml遠沈管に移して3000rpm、10分間遠沈

処理して細胞層と上澄み層に分離した。上澄み層のグルコース、乳酸の濃度は、YSI Model 2000 Glucose & Lactate Analyzer (YSI社製) で測定した。rsTM濃度はサンドイッチ型ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法^{6,4)}によって測定した。細胞数の計測は、細胞層をサンプリング時と同量のクリスタルバイオレット液(0.1M citric acid with 0.1% (w/w) crystal violet)に再懸濁し、37℃のCO₂インキュベータ内に1昼夜放置した後、放出された細胞核を顕微鏡下計測した^{2,2)}。死細胞由来の細胞核は着色の差によって区別し、主に生細胞由来の細胞核のみを計測した。

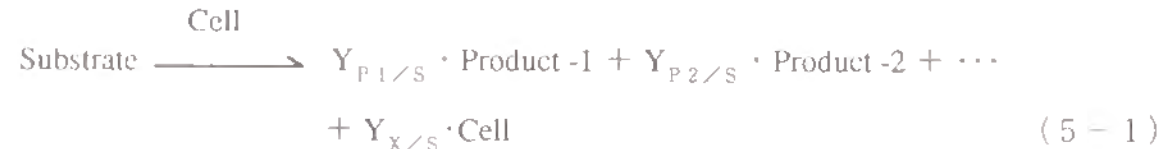
(rsTM α とrsTM β の分離)

回収した培養液を遠心器にかけ、浮遊懸濁している細胞及び浮遊物を除去した後、平均孔径が $2 \mu\text{m}$ のフィルターに通した。10N NaOHでpH7.5に調整後、0.15MNaCl-(0.02MTris-HCl)溶液(pH7.5)で平衡化したQ-Sepharose Fast Flow (Pharmacia-LKB) カラム($\phi 2.5\text{cm} \times 12\text{cm}$)に、試料を200ml流した。吸着操作の後、同じバッファーでカラムを洗浄し、NaClの濃度勾配(0.15MNaCl～1.2MNaCl in 0.02MTris-HCl,pH7.5)によって溶出し、5ml/fractionで分画した。溶出液は吸光度280nmの波長でモニターし、rsTM α とrsTM β を含む各フラクションを別々に回収して、ELISA法によってそれぞれの濃度を測定した。

5. 3 実験結果と考察

5. 3. 1 生物反応速度のモデリング

動物細胞培養における生物反応を忠実に表式化することは非常に困難である。簡単かつ合理的な方法としては、動物細胞を触媒と見なして、基質 (Substrate) がその触媒作用を受けて、細胞 (Cell) の生成を伴いつつ生成物 (Product) に変換され则认为る方式がある^{7,8)}。



ここで、 $Y_{P1/S}$ 、 $Y_{P2/S}$ と $Y_{X/S}$ は生成物及び細胞の収率係数であり、反応進行中に变化しうる変数である。本研究では、Substrateとしてはグルコース、Productとして、主生成物にトロンボモジュリン (rsTM)、副生成物に乳酸を取り上げる。式(5-1)の関係を利用すると、基質 (Substrate) としてのグルコースの消費速度 $[g/(l \cdot day)]$ は、

$$r_G = \nu_G \cdot X \quad (5-2)$$

と表せる。この式で、下付きGはグルコースであることを表している。 ν_G は比グルコース消費速度 $[mg/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{day})]$ 、Xは細胞密度 $[10^6 \text{ cells/ml}]$ を表している。

3. 3. 1において、比グルコース消費速度は通気方法、新鮮培地組成、培養液回収間隔等の培養条件の違いにもかかわらず、だいたい一定の値を示すことを述べた。このことは、培養液体積当りのグルコース消費速度 $[g/(l \cdot \text{day})]$ と細胞密度の間に、相関関係があることを意味している。実験A、実験B、実験Cの細胞密度と培養液体積当りグルコース消費速度の経時変化をFig.5-1に示した。細胞密度が高い場合、グルコース消費速度も高い値であり、同じような経時変化の傾向を示している。グルコース消費速度に対して、細胞密度の値を示したのがFig.5-2である。この結果から、グルコース消費速度と細胞密度は比例関係にあることがわかる。つまり細胞密度に比例してグルコース消費速度が増大するということは、培養条件が異なっても、単位細胞当りのグルコース消費量が一定であることを表しており、細胞密度の値にかかわらず比グルコース消費速度が一定であることを意味している。このことを証明しているのがFig.5-3である。この相関関係を式(5-2)に当てはめると、比グルコース消費速度である ν_G が一定値となり、式(5-3)が成立する。

$$\nu_G = 0.2 \text{ mg}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{day}) \quad (5-3)$$

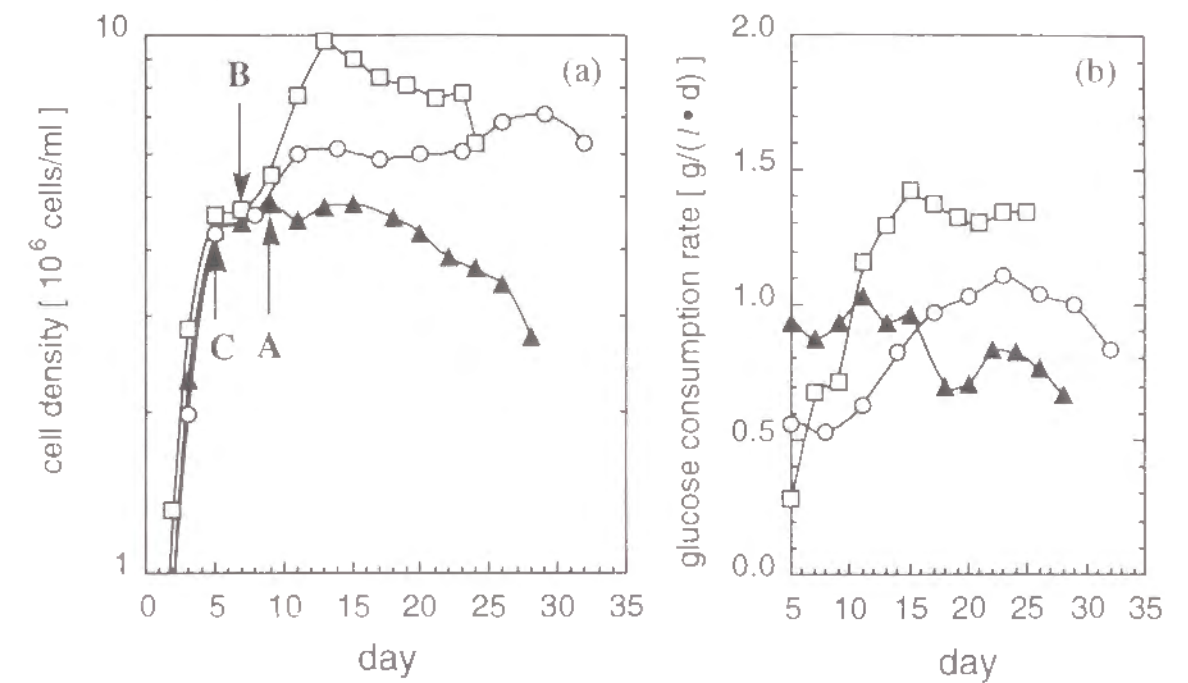


Fig.5-1 3LFMを用いた培養実験の細胞密度(a)と培養液体積当りグルコース消費速度(b)の経時変化

▲：実験A (調節ガス、 $G=3.15g/l$ 、2日サイクル)、□：実験B (純酸素、 $G=3.15g/l$ 、2日サイクル)、○：実験C (純酸素、 $G=6.15g/l$ 、3日サイクル)
図中矢印は無血清化した日を表す。

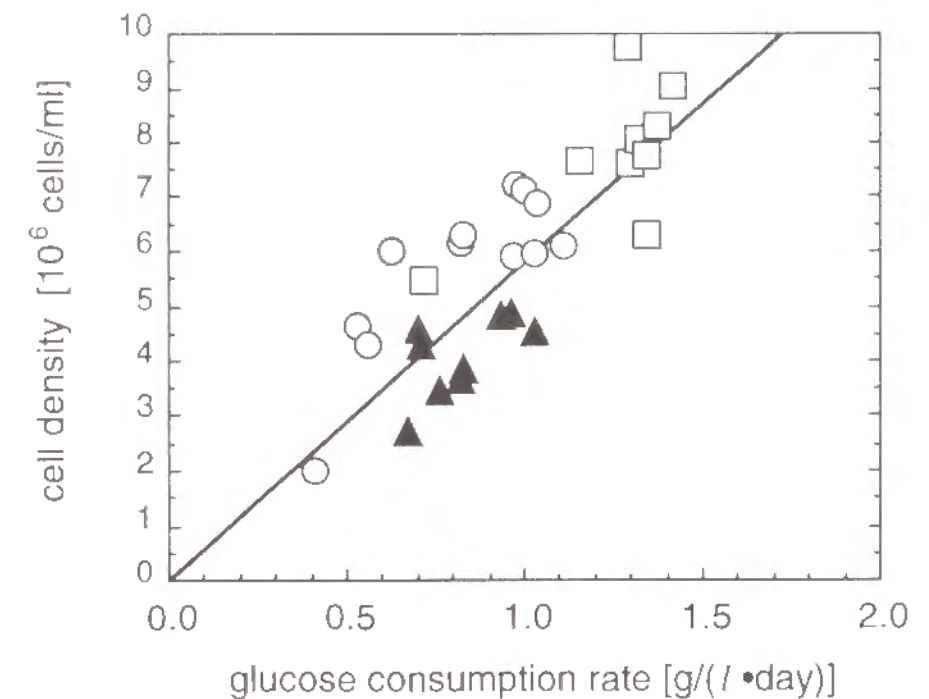


Fig.5-2 培養液体積当りグルコース消費速度と細胞密度の相関関係

▲：実験A、□：実験B、○：実験C

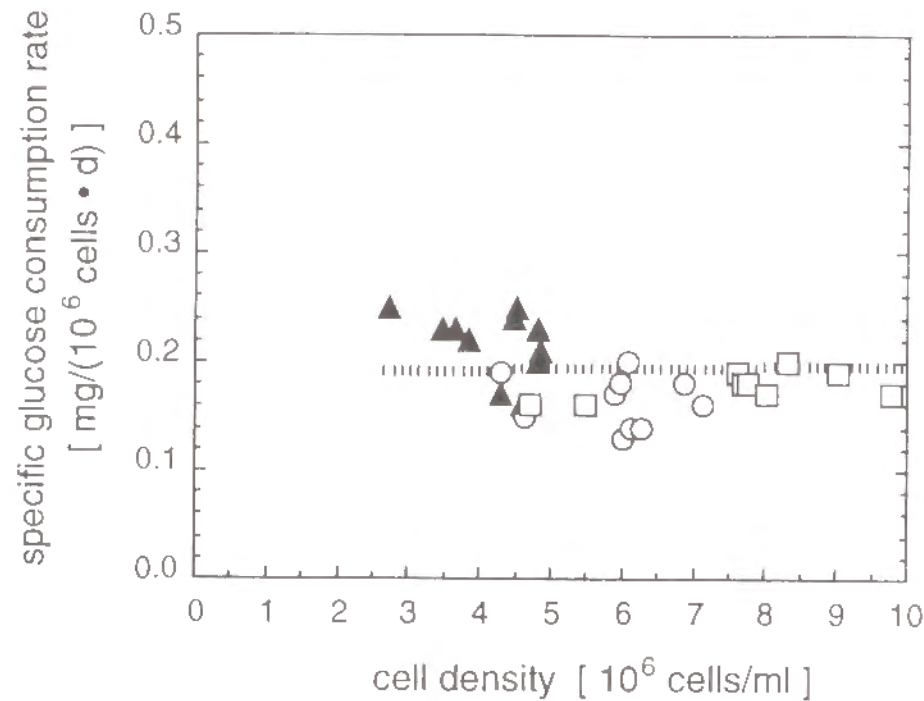


Fig.5-3 細胞密度と比グルコース消費速度の相関関係

▲：実験A、□：実験B、○：実験C

次に、動物細胞密度（X）についての反応速度 r_x [10^6 cells/(ml·day)]は、式(5-1)及び式(5-2)の関係から、

$$\begin{aligned} r_x &= Y_{x/g} \cdot (-r_g) \\ &= (Y_{x/g} \cdot \nu_g) \cdot X \\ &= \mu \cdot X \end{aligned} \quad (5-4)$$

と表せる。この式で、 $Y_{x/g}$ はグルコースに対する細胞（X）収率、 $(Y_{x/g} \cdot \nu_g)$ は比細胞増殖速度（ μ ）を表している。本細胞の場合、この値は2章で示したように、培養初期の細胞増殖期間においては、ミニジャーファーメンタを用いたマイクロキャリア培養で0.035 1/h～0.04 1/h、フラスコによる静置培養で0.04 1/hの値を示した。生産期である無血清培養の期間では、比細胞増殖速度（ μ ）の値が低下すると同時に、細胞の死滅速度が無視できなくなるため、細胞の増殖速度 [10^6 cells/(ml·day)]はかなり低下する。細胞の比細胞増殖速度（ μ ）の値は、直接測定することが不可能な値であり、かつ培養条件によってかなり変動する値でもあるため、本培養系においては表式化することは困難である。また、細胞密度の測定は5-1でも述べたように、本細胞系は核カウント法に依らざるを得ないため、かなりの時間を要する。細胞密度をオンライン測定する技術は浮遊系細胞での研究例はあるものの⁷⁹⁾、付着依存性細胞では

まだ確立されていない。従って、細胞密度をオンラインによって直接把握することは不可能である。このように、状態変数が直接測定できない場合、オンライン測定可能な別の因子を用いて、それらの因果関係を見いだすことによって間接的に推定する方法がある。培養系においては、グルコース濃度はオンラインで測定可能な因子である。式(5-2)に着目すると、 r_g はグルコース濃度を測定すれば算出可能な値であり、また ν_g は一定値であることがわかっている。従って、式(5-2)を変形した式(5-5)を用いて、オンラインのグルコース濃度測定値からグルコース消費速度を算出することによって、細胞密度が推定できることを示唆している。

$$X = (-r_g) / \nu_g \quad (5-5)$$

一方、生成物（Product）についての反応速度は、式(5-1)及び式(5-2)の関係から次式のように表せる。

$$\begin{aligned} r_p &= Y_{p/g} \cdot (-r_g) \\ &= (Y_{p/g} \cdot \nu_g) \cdot X \\ &= \nu_p \cdot X \end{aligned} \quad (5-6)$$

この式で、 r_p は生成物生産速度 [$mg/(l \cdot day)$]、 $Y_{p/g}$ はグルコースに対する生成物（P）収率、 $(Y_{p/g} \cdot \nu_g)$ は比生成物生産速度（ ν_p ） [$\mu g/(10^6$ cells·day)]を意味している。生成物としては、生理活性物質であるrsTMを扱う。培養条件の如何にかかわらず比グルコース消費速度はほぼ一定の値であったため、rsTM生産速度とは相関関係が認められなかったが、比乳酸生成速度に対しては、その値が低いほど比rsTM生産速度は高い値を示した。それらの関係を総括した $\Delta L / \Delta G$ 比と、比rsTM生産速度との間にもFig.5-4に示すように相関関係が認められた。 $\Delta L / \Delta G$ 比が低いときは乳酸生成速度も低く、比rsTM生産速度は高い値を示している。乳酸生成速度が低いということは、グルコースの代謝効率がよいため高エネルギー収率によって細胞活性も高いことを意味している⁷¹⁾。3章では、 $\Delta L / \Delta G$ 比を下げるような培養条件がrsTM生産性を高める要因であると結論したが、本章では代謝効率の指標でもある $\Delta L / \Delta G$ 比を状態変数として、比rsTM生産速度を表現するモデル式を導出した。

$$\nu_p = a - b \cdot \log (\Delta L / \Delta G) \quad (5-7)$$

式(5-7)で ν_p は比rsTM生産速度 [$\mu g/(10^6$ cells·day)]、 a の値は7.46、 b は3.03であり、最小二乗法により導いた定数である。

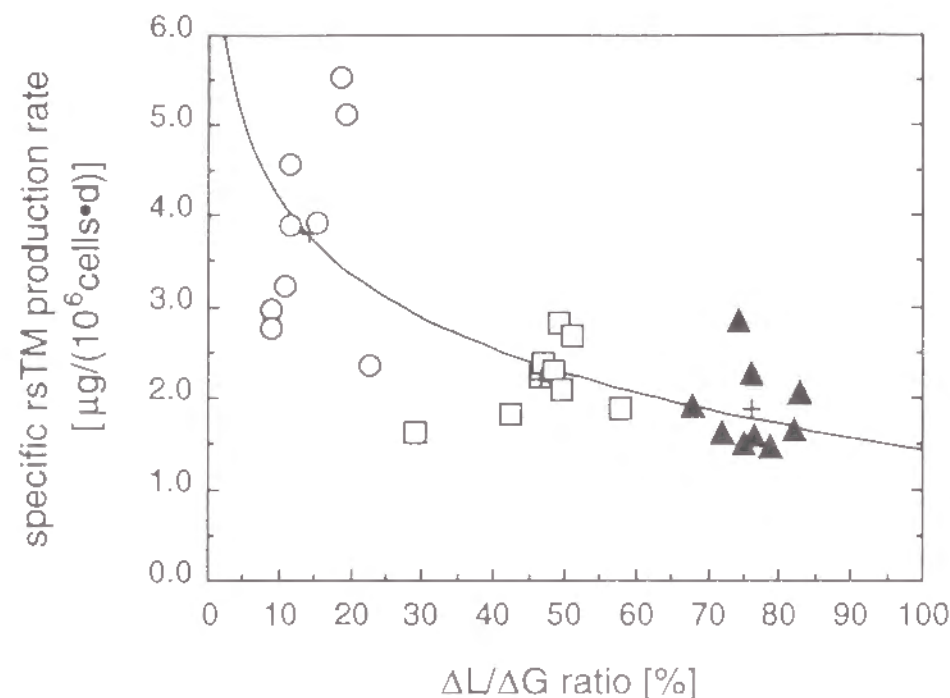
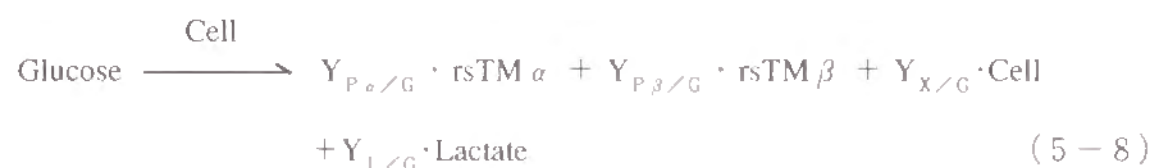


Fig.5-4 $\Delta L / \Delta G$ 比と比rsTM生産速度との相関関係

▲：実験A（調節ガス、 $G=3.15\text{g/l}$ 、2日サイクル）、□：実験B（純酸素、 $G=3.15\text{g/l}$ 、2日サイクル）、○：実験C（純酸素、 $G=6.15\text{g/l}$ 、3日サイクル）
+：各実験毎の平均値

4章では、CHO(21)によって生産されたトロンボモジュリンには、rsTM α 体とグリコサミノグリカン側鎖を付加したrsTM β 体が存在していることを示した。式(5-1)を本研究に当てはめて表現すると、式(5-8)のようになる。



この式で、下付きの P_{α} 、 P_{β} 、 L は、rsTM α 、rsTM β 、乳酸であることを表している。rsTM α に比べrsTM β の方が比活性が高いため、選択的にrsTM β の生産速度を高めることが重要であることを述べた。従って、rsTM α 及びrsTM β の生産速度を間接的な方法で推定できるならば有用な情報となる。rsTM α 体とrsTM β 体の反応速度と、総rsTMの反応速度との関係を表すと式(5-9)になる。

$$r_p = r_{p_{\alpha}} + r_{p_{\beta}} \quad (5-9)$$

この式で、 $r_{p_{\alpha}}$ 、 $r_{p_{\beta}}$ はrsTM α 及びrsTM β の培養液体積当りの生産速度[mg/(l·day)]を表す。

Fig.4-6で示したように、培養液体積当りの総rsTM生産速度と、rsTM α 及びrsTM β の生産速度との間には直線関係が認められた。即ち、総rsTM生産速度を指標として、rsTM α とrsTM β の生産速度、及びそれらの生産比率（ β / α 比）が推定できることを示唆している。Fig.4-6の直線関係を最小二乗法を用いてモデル式を導出した。

$$\begin{aligned} r_{p_{\alpha}} &= 1.12 + 0.41 \cdot r_p \\ r_{p_{\beta}} &= -1.12 + 0.59 \cdot r_p \quad r_p > 1.9 \end{aligned} \quad (5-10)$$

5. 3. 2 動物細胞密度と生理活性物質生産速度推定のアルゴリズム

グルコースや乳酸等のオンラインで測定可能な因子を利用して、培養状態の良否をリアルタイムで推定することは、制御系を構築する意味においては不可欠の方法である³¹。また、工業規模での生産においても重要な役割を果たすことになり、技術の蓄積と向上が望まれている。

本研究にて提案する推定法は、オンライン測定可能なグルコース及び乳酸濃度というわずか二つの情報をもとに、5. 3. 1で導出した種々のモデル式を利用して、細胞密度や生理活性物質の生産量を推定するものであり、以下に示す3つのステップによって構成される。

- Step 1：グルコース消費速度（ $-r_G$ ）と式(5-3)の $\nu_G = 0.2 \text{ mg}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{day})$ から、式(5-5)を用いて細胞密度を推定
- Step 2：式(5-7)を用いて、 $\Delta L / \Delta G$ 比から比rsTM生産速度（ r_p ）を推定し、細胞密度と比rsTM生産速度の推定値を用いて式(5-6)からrsTMの生産速度及び培養液中濃度を導出
- Step 3：式(5-10)を用いて、rsTM生産速度からrsTM β 体とrsTM α 体の生産速度を推定

推定アルゴリズムのフロー図をFig.5-5に示す。

Step 1では、5. 3. 1で導出した式(5-5)の生物反応速度式を式(5-11)のように変形した。

$$\tilde{X}_n = -(\Delta G_n / \Delta t_n) / \nu_G \quad (5-11)$$

この式で、 t は時間、下付きの n は無血清培養での培養液回収サイクル数、上付きの“ \sim ” は推定値であることを表している。 ν_G については式(5-3)を用いた。

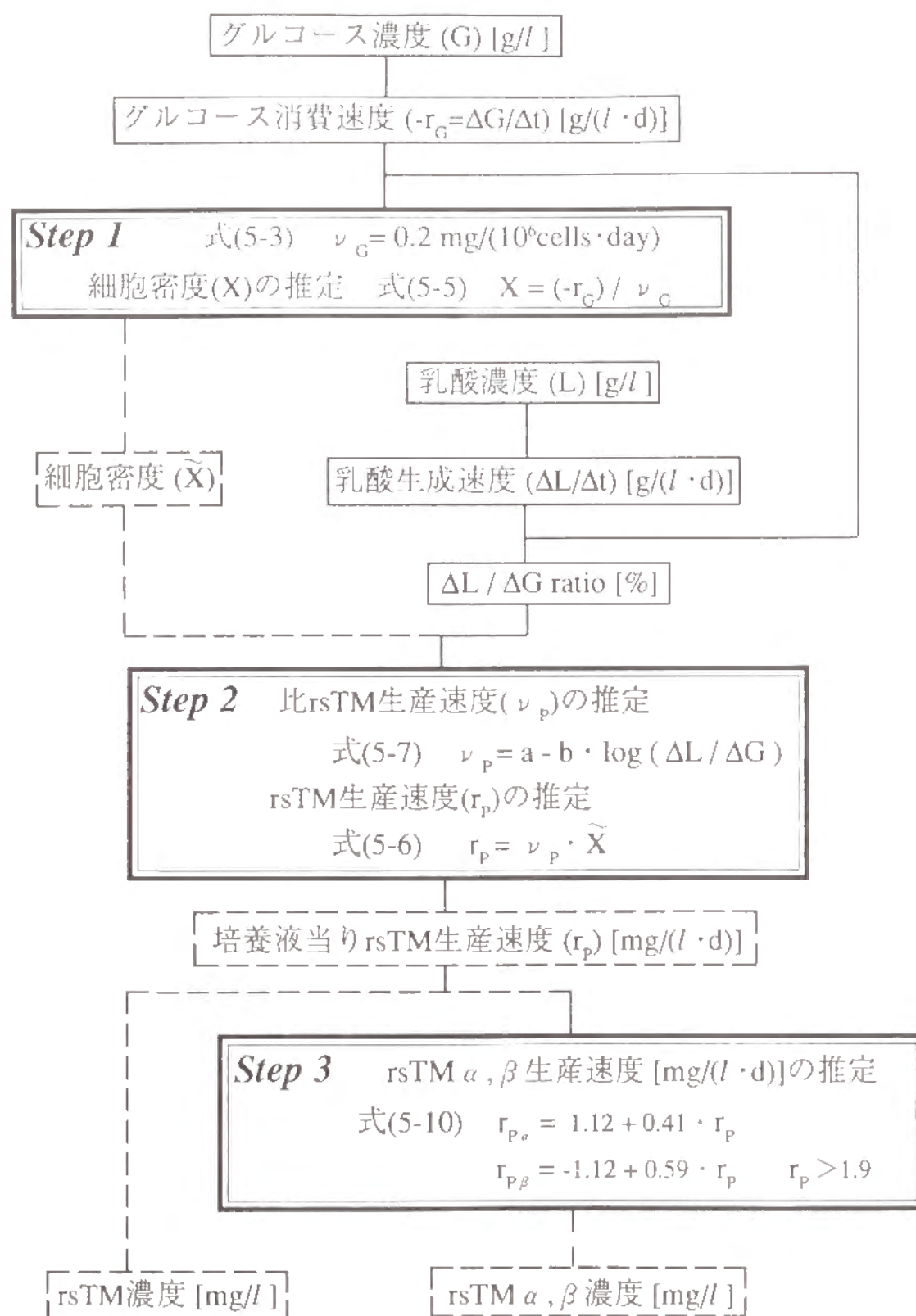


Fig.5-5 細胞密度、rsTM生産性および β/α 比推定機構のフロー図
実線は測定値あるいは計算値、破線は推定値のフローを表す。

Step 2でrsTM生産速度[$\text{mg}/(\text{l} \cdot \text{day})$]及び培養液中濃度[mg/l]を推定するために、rsTM生産に関する生物反応速度式(5-6)を、Step 1と同様に変形した。式(5-12)に示す

$$(\Delta P_n / \Delta t_n) = \nu_p \cdot \tilde{X}_n \quad (5-12)$$

式(5-12)で、PはrsTMの培養液中濃度[mg/l]を表しており、 ν_p は式(5-7)を用いて各回収サイクルの $\Delta L / \Delta G$ 比から算出した。繰返し回分培養系では、 $\Delta L / \Delta G$ 比は回収培養液と新鮮培地中のグルコースと乳酸の濃度の値を用いた。

Step 3でrsTM α とrsTM β の生産速度[$\text{mg}/(\text{l} \cdot \text{day})$]及び培養液中濃度[mg/l]を推定するために、式(5-10)を用いた。式(5-10)中の r_p は式(5-13)で表される。

$$r_p = (\Delta P_n / \Delta t_n) \quad (5-13)$$

5. 3. 3 繰返し回分培養系における培養状態量推定法の確立

5. 3. 2で示した推定アルゴリズムの中で用いているモデル式は、実験A(細胞増殖期：DMEM+10%FBS、9日間)、実験B(T+5%FBS、7日間)、実験C(T+5%FBS、5日間)の実験データに基づいて導出されたものである。これらの実験では、培養初期において10%FBSと5%FBSを使用していた。本章では、この推定法の適用性を繰返し回分培養系で評価するために、培養初期において2.5%FBSを使用した実験(実験E)を行った。そして、血清濃度に対する依存性も合わせて評価した。

実験Eでは2.5%FBSを含むT-mediumで6日間細胞増殖を行った後に、T+ITES培地に置換して無血清培養を行った。新鮮培地中グルコース濃度は6.15g/lとし、3日毎に培養液を回収して新鮮な無血清培地と交換した。通気は純酸素(0.1l-O₂/min)を用いてオン-オフ制御を行った。設定値は純酸素飽和値の20%であり、比較的よく設定値が維持できた。5%血清を用いた実験Cと実験結果の比較をすると、rsTM濃度、グルコース濃度、乳酸濃度等については同様な経時変化の傾向を示した。回収培養液中のrsTM濃度の最大値はおよそ70mg/lまで達し、6バッチサイクルの平均値は50mg/l以上であった。rsTM生産速度の平均値については、培養液体積当りの速度が約16mg/(l·day)、比速度が3.9 $\mu\text{g}/(10^6\text{cells} \cdot \text{day})$ であり、2.5%という低濃度の血清を用いた場合でも、十分なrsTMの生産性が得られることが証明できた。実験Eにおいて、使用した血清量に対するrsTMの生産量は、50ml-FBSに対して309mg-rsTMであり、約6.2mg-rsTM/ml-FBSとなった。この値はコストパフォーマンスに優れ、工業的規模においても十分に成立する値である。

Fig.5-6に、実験Eの細胞密度の結果と推定結果を示す。推定に用いた培養液体積当りのグルコース消費速度 $[g/(l \cdot day)]$ は各回収サイクル毎の平均値であるため、実験値としての細胞密度も各サイクル毎の平均値を示した。Fig.5-6中の矢印は、無血清培養を開始した日を表している。血清を用いた初期の細胞増殖期ではあまりよい一致は見られないが、無血清培養期間においては実験値と推定値がかなり良く一致している。推定アルゴリズムで使用しているモデル式を導出した実験は、培養初期の細胞増殖期において10%FBSと5%FBSを使用していたが、実験Eでは2.5%FBSを用いたにもかかわらず、生産期の無血清培養においては良好な推定が達成できた。従って、初期培養での血清濃度は、生産期の細胞密度の推定には影響がないことがわかった。即ち、細胞増殖期において2.5~10%FBSの範囲であれば、その後の無血清培養における細胞増殖とグルコース消費との相関関係は全く同じ特性を持っていると結論できる。

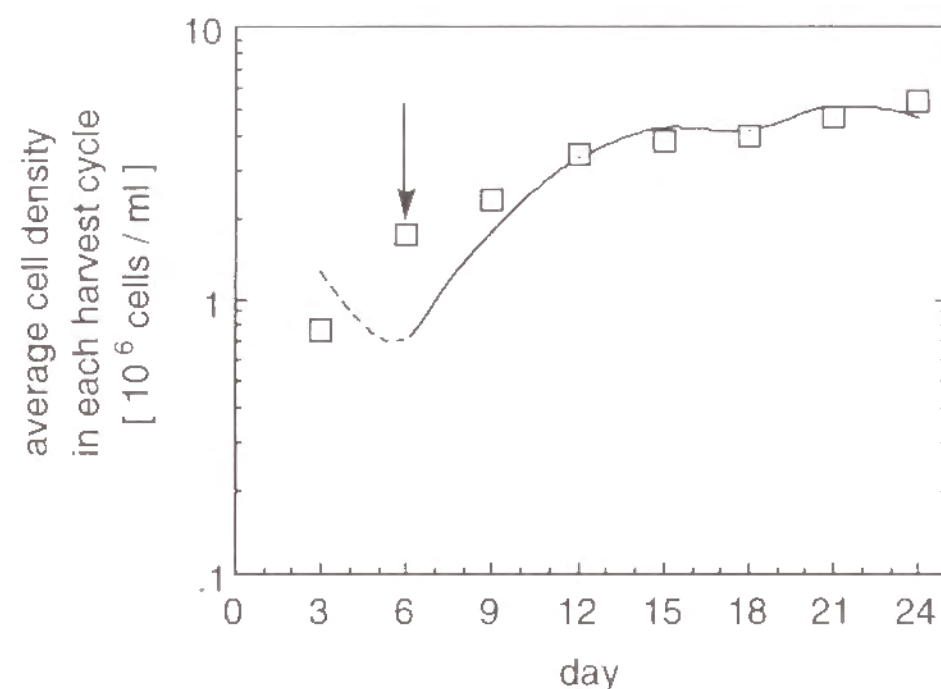


Fig.5-6 細胞密度の推定結果

□：細胞密度（実験E）の実験結果
—：細胞密度の推定結果（式(5-5) $X=(-r_G)/\nu_G$ ）
図中の矢印は無血清化した日を示す。

培養液体積当りのrsTM生産速度と回収培養液中rsTM濃度の、実験結果と推定値をFig.5-7に示す。各サイクルのrsTM生産速度の実験結果はバッチサイクル内の平均値、rsTM濃度の実験結果は培養液回収時の値である。一方、推定値は、各バッチサイクルの平均細胞密度と平均の比rsTM生産速度の推定値を用いて算出した値である。かなり良好な一致を示しており、生理活性物質の生産性を推定するには十分な結果が得られた。本推定アルゴリズムでは日オーダーの推定であるが、動物細胞培養系は微生物培養系と比較するとかなり培養期間が長く、時間単位での系の変化はごく僅かであるため、その変化を時間単位で把握することは困難であると同時に必要性が低い。従って、動物細胞培養系では日オーダーのデータ管理が必要十分な情報となる。その意味で、Fig.5-7の結果は本実験系ではかなり有意義なものである。

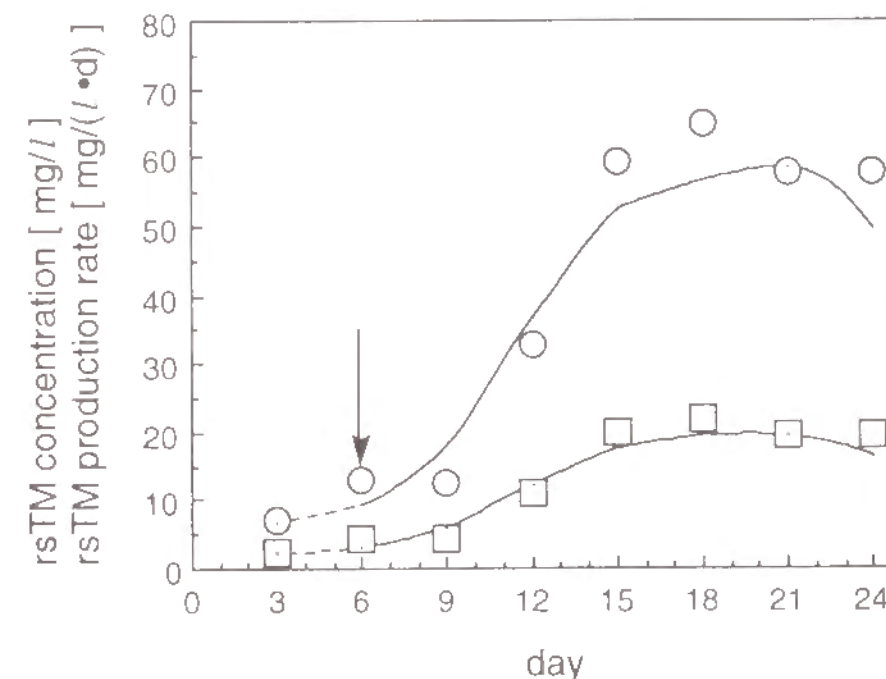


Fig.5-7 rsTM生産性の推定結果

□：rsTM生産速度の実験結果、—：その推定結果（式(5-6) $r_p=\nu_p \cdot X$ ）
○：培養液中のrsTM濃度の実験結果、—：その推定結果（式(5-12) $\Delta P/\Delta t=r_p$ ）
図中の矢印は無血清化した日を示す。

式(5-10)を用いて、rsTM α 、rsTM β の生産速度から算出した回収培養液中のそれぞれの濃度と β/α 比の推定結果をFig.5-8に示す。Fig.5-8の推定結果からは β/α 比の推移が読み取れる。実験初期においてはrsTM β の比率が低く、実験後期で安定的にrsTM β 体が生産されていることが推察される。ローラーボトルや血清含有培地を用いたマイクロキャリア浮遊培養系での実験結果は、このような傾向を示しているため、本推定結果は、無血清培地を用いたマイクロキャリア浮遊培養系においても、同様の傾向があることを示唆している。本実験では、 β/α 比の実験結果と推定値の比較は、各バッチサイクル毎ではなく、実験を通してトータルの結果について比較を行った。実験Eで回収した6バッチサイクル分の無血清培養液中のrsTM α 、rsTM β の生産量は、それぞれ146mg、139mgであった。一方、推定結果からもとめたrsTM α 、rsTM β の推定総量は128mg、133mgであるので、かなり良い一致が認められた。

以上の述べてきた結果から、培養初期の血清濃度が異なるにもかかわらず、細胞密度、生理活性物質生産速度、培養液中生理活性物質濃度、 β/α 比等、の実験値と推定値がよく一致しており、繰返し回分培養系での本推定法の実用性を証明することができた。

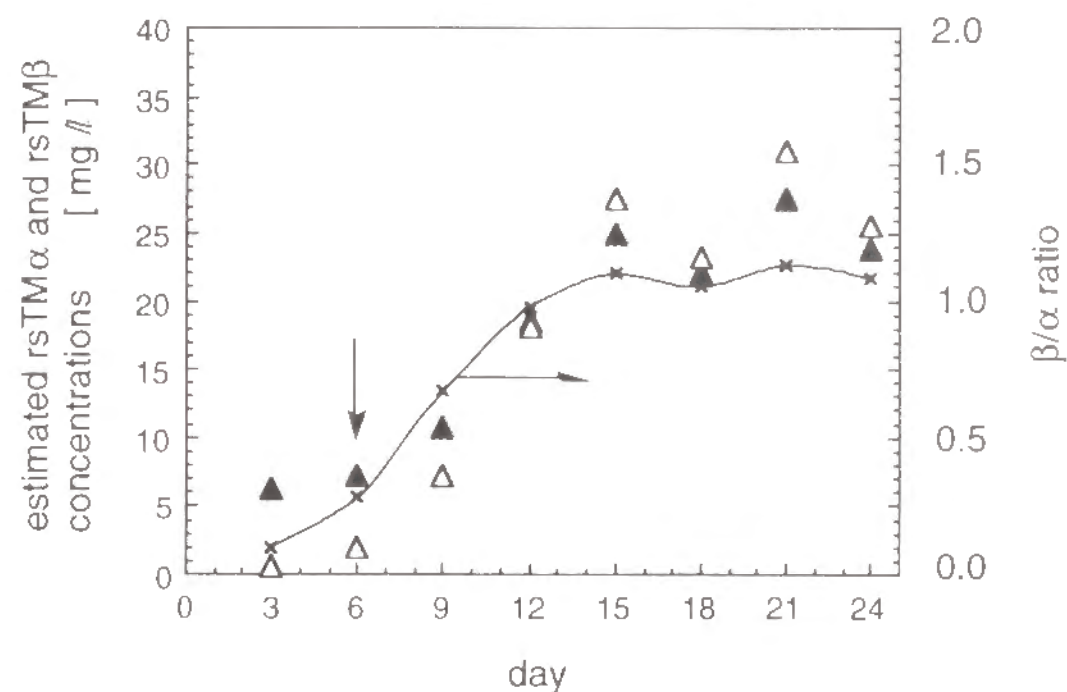


Fig.5-8 rsTM α およびrsTM β 生産性の推定結果

▲：培養液中のrsTM α 濃度の推定結果 ($\Delta P_{\alpha}/\Delta t=1.12+0.41 \cdot r_p$)
 Δ ：培養液中のrsTM β 濃度の推定結果 ($\Delta P_{\beta}/\Delta t=-1.12+0.59 \cdot r_p$)
 \times ： β/α 比の推定結果 ($\Delta P_{\beta}/\Delta P_{\alpha}$)
 図中の下向き矢印は無血清化した日を示す。

5. 4 結言

動物細胞培養では、目的を達成するためにpHや温度、溶存酸素濃度等の培養条件を一定値にコントロールする方法がよくとられる³⁵⁾。このアプローチ法では必ずしも培養が良好な状態に維持できているかどうかは判断できない。本来はこれらの状態量を一定に維持することが目的なのではなく、例えば細胞数を多く獲得することや、目的物質の生産量を上げることが最終目的である。動物細胞では、細胞増殖やタンパク質の生産について分子生物学的、或は生化学的なメカニズムはかなり明らかにされつつあるものの^{71)、80) 81)}、それらの現象論を定量的に表現することは極めて困難である^{38)~39)、82) 84)}。このような状況下では、培養環境をどのようにコントロールすれば、目的関数を最大にできるかが手探りの状態となる。本研究では、培養状態を生化学的因子に基づいてモデリングを行い、細胞密度や生理活性物質の生産性を定量的に表現することができた。グルコースや乳酸の他にも、もっと直接的な因子が数多く存在していることが予想される。しかし、工学的に有効な測定技術を考慮すると、グルコースや乳酸等の生化学的物質が限界であり、DNAやRNAなどの分子生物学的な因子を工学的に応用展開するには、まだ時間がかかりそうである。

本章では、測定結果を得るためのタイムラグが長い細胞数や生理活性物質の生産性に関して、生化学的因子を用いてそれらの状態量を推定する方法論を提唱することができた。即ち、

- ①：培養液中グルコースの濃度測定を利用して、細胞数の推定を可能にした。
- ②：培養液中のグルコースと乳酸の濃度から、生理活性物質の生産速度と培養液中濃度の推定を可能にした。
- ③：糖鎖付加が異なるタイプのタンパク質についても、それぞれの生産速度と培養液中濃度の推定を可能にした。
- ④：細胞増殖期に用いる血清などの培養条件が異なる場合においても、本推定法が適用できることを示した。

推定精度や測定の間隔についてはまだ課題が残されているが、動物細胞培養においてはある意味では充分といえる。rsTM α 体とrsTM β 体のように、糖鎖付加に関するタンパク質の生産性を推定できるようになったことは将来的にも期待は大きい。

| | |
|---------------------|---|
| a | : 式(5-7)のパラメータ |
| b | : 式(5-7)のパラメータ |
| G | : 培養液中グルコース濃度 [g/l] |
| L | : 培養液中乳酸濃度 [g/l] |
| n | : 無血清培養期間での培養液回収サイクル数 |
| P | : 培養液中rsTM濃度 [mg/l] |
| P_{α} | : 培養液中rsTM α 濃度 [mg/l] |
| P_{β} | : 培養液中rsTM β 濃度 [mg/l] |
| r_G | : グルコース消費速度 [g/(l·day)] |
| r_P | : 生成物生産速度 [mg/(l·day)] |
| $r_{P_{\alpha}}$ | : 培養液体積当りのrsTM α 生産速度 [mg/(l·day)] |
| $r_{P_{\beta}}$ | : 培養液体積当りのrsTM β 生産速度 [mg/(l·day)] |
| r_X | : 動物細胞増殖速度 [10^6 cells/(ml·day)] |
| t | : 時間 [day] |
| X | : 細胞密度 [10^6 cells/ml] |
| \hat{X} | : 細胞密度の推定値 [10^6 cells/ml] |
| $Y_{L/G}$ | : グルコースに対する乳酸の収率係数 |
| $Y_{P/G}$ | : グルコースに対する生成物の収率係数 |
| $Y_{P/S}$ | : 基質に対する生成物の収率係数 |
| $Y_{P_{\alpha}/G}$ | : グルコースに対する生成物 (rsTM α) の収率係数 |
| $Y_{P_{\beta}/G}$ | : グルコースに対する生成物 (rsTM β) の収率係数 |
| $Y_{X/G}$ | : グルコースに対する細胞の収率係数 |
| $Y_{X/S}$ | : 基質に対する細胞の収率係数 |
| β/α 比 | : rsTM β 生産量/rsTM α 生産量の比率 [%] |
| $\Delta L/\Delta G$ | : 乳酸生成量/グルコース消費量 [%] |
| μ | : 比細胞増殖速度 [1/h] or [1/day] |
| ν_G | : 比グルコース消費速度 [mg/(10^6 cells·day)] |
| ν_P | : 比rsTM生産速度 [μ g/(10^6 cells·day)] |

第6章 付着依存性動物細胞を用いた連続培養系の特性と培養状態推定法の応用

6.1 緒言

第3章から第5章では、繰返し回分培養系において、その培養特性やrsTMの生産性について種々考究した結果を示してきた。本章では、繰返し回分培養系と連続培養系における本CHO-K1細胞(CHO(21))培養の比較をする意味も含めて、連続培養系の代表例であり、かつ工業的規模へのスケールアップ実績もある流動層型パーフージョンバイオリアクター⁵¹⁾を採用して、実験を行い考察を加えた。本流動層型バイオリアクターは、体積の小さい流動層内でマイクロキャリア上に付着した細胞を循環液により攪拌し、流動状態を常に維持することができる。また培養液を外部循環させることによって、溶存酸素や温度を効率良くコントロールできるという特性を持っている。

繰返し回分培養系では、各バッチサイクル内で常に培養状態が変化する非定常状態にある。これに対し、連続系では回分培養に比べて培養状態の変動は少ない。どちらの培養形態が適しているかは、個々の細胞特性に大きく依存する。抗体を産生するハイブリドーマ細胞では、細胞を固定化した連続培養系⁸⁵⁾やエアリフト型のかん流培養系⁸⁶⁾に適用した研究例がある。本章では、CHO(21)をこの流動層型パーフージョンバイオリアクターに適用し、その培養特性について生物反応速度論的な解析を行った。連続培養では培養初期に用いる血清濃度のさらなる低減に成功し、無血清化後に培養特性が大きく変化することを見いだした。

流動層型バイオリアクターでは流動層内部の体積が小さく、細胞のサンプリングを頻繁に行うと、雑菌汚染の問題や系内の挙動を乱す原因にもなる。また、セラミック型⁸⁷⁾やホローファイバー型バイオリアクター^{44), 88)}では、細胞を閉鎖系内に固定化するため細胞のサンプリングが困難である。従って、これらの培養系では細胞数の把握が難しいため、生理活性物質等の生産性に影響を与える要因を解析する場合、大きな問題となる。これらのような培養系において、間接的に細胞数が推定可能になればメリットはかなり大きい。そこで本章では、第5章で開発した繰返し回分培養系での推定法を本連続培養へ適用することによって、細胞数の把握と生理活性物質生産量の推定を試みた。また、繰返し回分培養系から導出したモデル式のパラメータを変えてシミュレーションを行い、連続培養系における細胞状態や特性の変化について考察を加えた。

6. 2 実験材料と実験方法

(実験材料)

基本合成培地は、1リッター当り6.15gまでグルコースを増量したT-medium（日本製薬）を用いた。血清は細胞増殖や目的物質の生産性について、ロット検査を行った牛胎児血清(Fetal bovine serum : FBS)（Gibco社製）を用いた。無血清培養で用いたT+ITES培地中の添加物としては、Daigo-ITES（日本製薬）を希釈して使用した。希釈後の培地中標準濃度は、それぞれインスリン：2.0mg/l、トランスフェリン：2.0mg/l、エタノールアミン：0.122mg/l、亜セレン酸ナトリウム：0.009mg/lである。

細胞は、CHO-K1細胞にプラスミドpRS7TM-neoを導入して形質転換を行った付着依存性CHO-K1-RS7TMneo-No.21細胞(CHO(21))を使用した⁶⁴⁾。T25型フラスコ(Corning社製)を用いて、T+10%FBS培地で2日～3日に一回培地交換しながら維持培養を行い、増殖が安定した細胞をそれぞれの実験に使用した。

マイクロキャリアは、平均粒径が500 μ mの多孔性コラーゲン質のVX-100（Verax社製）を使用した。使用する前に1%血清入り培地中で3日間馴化させて使用した。

(培養方法)

連続系のパーフュージョン式培養実験はSystem one（Verax社製）を用いた。System oneはFig.6-1に示すように、流動層生物反応器（循環部を含む体積：40ml）、ガス交換用の透過性シリコンチューブを内包する培養上澄み液循環ループ、ヒーター、リサイクルフローポンプ、pHセンサー、溶存酸素(DO)計、温度計、培地流入路、培養液回収路から成る。細胞は、T75フラスコで培養したものを、約 $5\sim 8\times 10^7$ 個播種した。DO及び温度は、コントロールユニットで通気ガス組成を調節することによって、それぞれ100～160mmHg、37℃に設定して定値制御を行った。培養液は流動層の上部から循環ループに入り、再度流動層に流入するという経路を常時循環させた。循環のための流速は、初めの2日間は100ml/minとし、以降は140～160ml/minとした。新鮮培地の供給と培養液の回収は同じ流速で連続的に行った。細胞のサンプリングは行わず、培養上澄み液のみ、流動層生物反応器上部から採取した。

(測定方法)

上澄み液のグルコース、乳酸の濃度をYSI Model 2000 Glucose & Lactate Analyzer（YSI社製）で測定した。rsTM濃度はサンドイッチ型ELISA(enzyme-linked immunosorbent assay)法⁶⁴⁾によって測定した。

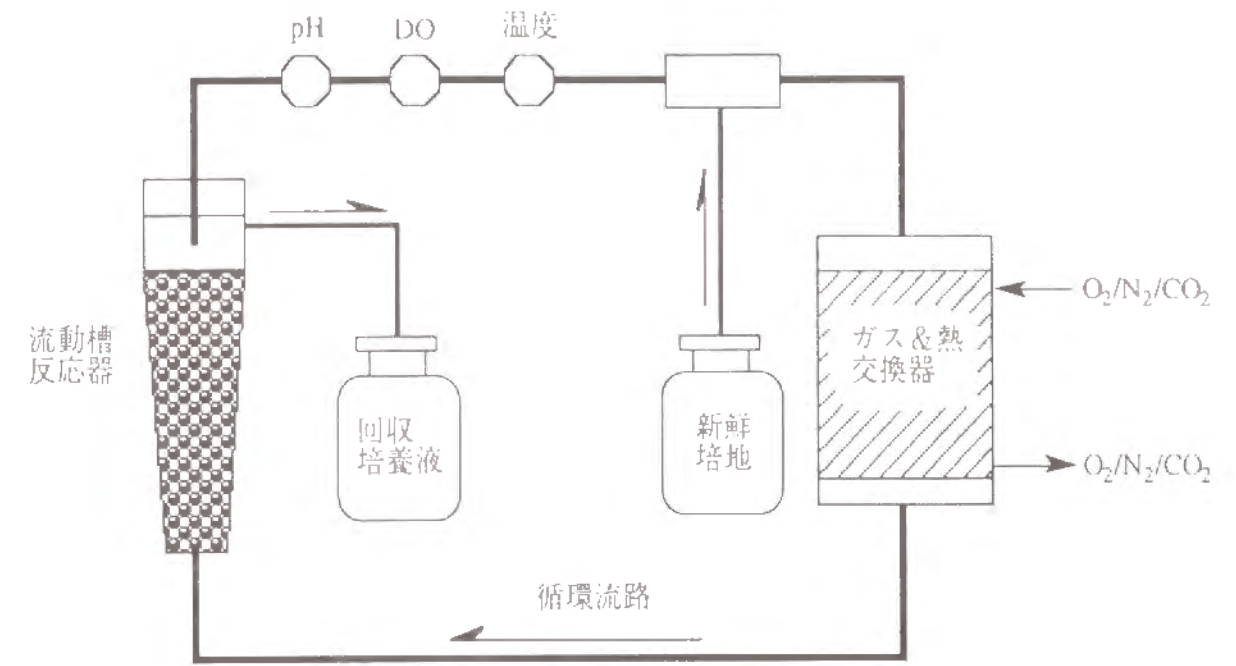


Fig.6-1 流動層連続細胞培養システム(Verax system 1)の概略図

6. 3 実験結果と考察

6. 3. 1 動物細胞連続培養系の特性

rsTMを発現するCHO(21)を流動層型連続培養系に適用し、その培養特性解析を行った。培養初期の血清濃度を下げることが目的として、低濃度の血清含有培地中で細胞増殖を行い、引続き6.15g/lのグルコースを含有するT+ITES培地で無血清培養を行った。実験aではT-medium+1%FBSを用いて16日間培養を行い、16日目にT+ITES培地に交換し無血清培養を行った。新鮮培地を244ml/dayの流速で連続的に供給し、同時に培養液を同じ流速で抜き取った。Fig.6-2aに示すように、培養液中のrsTM濃度は、無血清化後に急激に上昇し、29日目には52mg/lまで達した。この結果から、初期培養において1%という極めて低濃度の血清を用いても無血清化は可能であり、十分なrsTM生産性が確保できることがわかった。

一方、実験bでは、さらに血清コストを下げることを目的として、初期の血清培養期間を短縮して10日目にT+ITES培地に交換し無血清培養を行った。新鮮培地の供給と培養液の抜き取りの速度を僅かに上げて278ml/dayで行ったところ、rsTM濃度は27日目に57mg/lに達した。連続培養におけるこの濃度は、15mg/dayの生産速度に相当している。実験aに比べると、初期の血清培養期間が短く希釈率が高ったにもかかわらず、高濃度のrsTM発現が認められ、かつ20日間以上の無血清培養が維持できた。この結果より、無血清培養下で高rsTM生産性を成功させるためには、10日間の初期血清培養期間で充分であることが明らかになった。実験bにおいて、使用した血清量に対するrsTMの生産量は、22.3ml-FBSに対して175mg-rsTMであった。この値は、約7.8mg-rsTM/ml-FBSとなり、実験Eでの6.2mg-rsTM/ml-FBSよりもよい結果が得られた。実験a及び実験bの培養条件と主な実験結果を、Table 6-1にまとめた。

実験a、実験bともに、初期の1%血清含有培地での培養期間は、rsTM濃度は低レベルであるが、無血清培養に切り替えてから急激にその濃度が上昇し始めている(Fig.6-2a)。Fig.6-2bに示すように、両方の実験において無血清化とともにグルコース消費速

Table 6-1 培養条件と実験結果

| | 細胞増殖期間 [day] | 増殖期培地 | 無血清培地 | 希釈速度 [ml/day] | 到達rsTM濃度 [mg/l] |
|------|-----------------|---------|--------|--------------------|----------------------|
| 実験 a | 16 | T+1%FBS | T+ITES | 244 | 52 |
| 実験 b | 10 | T+1%FBS | T+ITES | 278 | 57 |

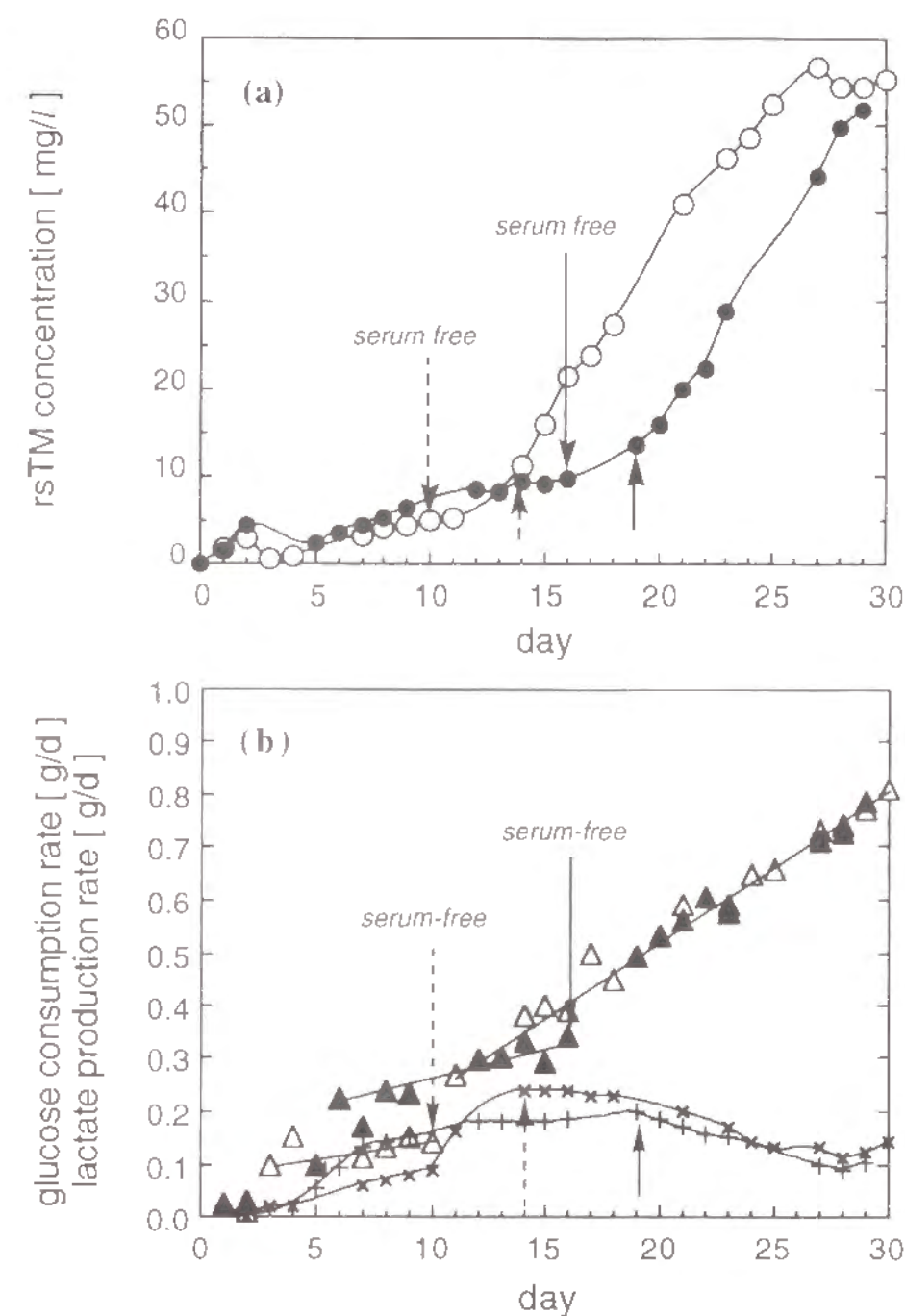


Fig.6-2 流動層連続細胞培養実験結果

- (a) 培養液中のrsTM濃度 ●：実験a、○：実験b
 (b) グルコース消費速度 ▲：実験a、△：実験b
 乳酸生成速度 +：実験a、×：実験b

図中下向きの矢印は無血清化した日、上向きの矢印はrsTM濃度が急激に上昇し始めた日(a)と乳酸生成速度が下降し始めた日(b)を表す。

度が上昇する一方、乳酸生成速度については、どちらの実験でも無血清化してからだいたい3日後に下降し始めている。Fig.6-2aとFig.6-2bを比較すると、実験a、実験bともに、rsTM生産速度が上昇し始めた日（実験a：19日目、実験b：14日目）と乳酸生成速度が下降し始めた日が一致している。これらの結果は、無血清化することによって細胞の代謝特性が変化したことを表しており、グルコースを効率的に資化して高エネルギー収率を獲得することによって、rsTM生産速度が増大したことを示唆している。

無血清培地に切り替えた日を基準に、両実験のrsTM濃度と生産速度の変化をFig.6-3に示した。無血清培養期間だけについて比較すると、実験aの方がrsTM濃度は若干高い値を示しているものの、実験bの方が希釈速度がわずかに速い分だけrsTM生産速度はほぼ同じレベルになっている。この結果は、初期血清培養期間が16日間或は10日間でも、その後の無血清化培養におけるrsTM生産性には影響ないことを表しており、10日間の初期血清培養期間で充分であることを証明している。

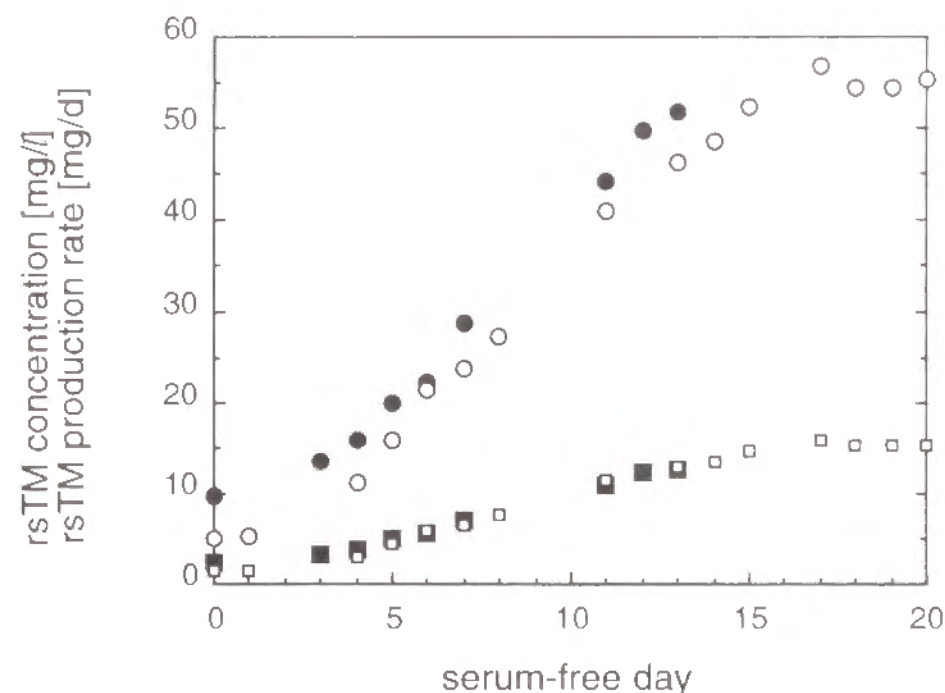


Fig.6-3 無血清化後のrsTM生産性特性

培養液中のrsTM濃度 ●：実験a、○：実験b
rsTM生産速度 ■：実験a、□：実験b

6. 3. 2 連続培養系への推定法の適用とモデル式の検証

連続培養に用いられるホローファイバー型やパーフュージョン型バイオリアクターでは、細胞や培養液のサンプリングによって系内の挙動に対して外乱を与えたり、雑菌汚染の原因になり易い。従って、細胞やマイクロキャリア等の過度のサンプリングは避けなければならない。そこで第5章で示したモデル式を用いた推定法を、本連続培養の実験系に対して適用することによって、細胞のサンプリングをすることなくrsTMの生産性を推定することが可能かどうか、その実用性を評価した。

第一段階として、連続系での物質収支をとり、一日当りのグルコース消費量から総細胞数を推定した。これは5章で示した繰返し回分培養系での推定アルゴリズムの中のステップ1に相当する。次に式(5-7)を用いて $\Delta L / \Delta G$ 比から比rsTM生産速度を算出し、総細胞数と比rsTM生産速度の推定値を用いて、一日当りのrsTMの生産速度及び培養液中濃度を算出した。連続系でのグルコースとrsTMの物質収支式を、式(6-1)及び式(6-2)にそれぞれ示す。

$$d(V \cdot G) / dt = F_{in} \cdot G_{in} - F_{out} \cdot G_{out} - \nu_G \cdot (X \cdot V) \quad (6-1)$$

$$d(V \cdot P) / dt = F_{in} \cdot P_{in} - F_{out} \cdot P_{out} + \nu_P \cdot (X \cdot V) \quad (6-2)$$

これらの式で、 V はリサイクルループを含むリアクター部分の体積[l]、 G はグルコース濃度[g/l]、 t は時間[day]、 F は培地の供給と回収の速度[l/day]、 $(X \cdot V)$ は総細胞数、 P はrsTM濃度[mg/l]を表す。下付の i は流入項、 o は流出項を意味している。また、 ν_G は比グルコース消費速度[mg/(10^6 cells·day)]、 ν_P は比rsTM生産速度[μ g/(10^6 cells·day)]を表す。

式(6-1)及び式(6-2)で、 $dV/dt = 0$ 、 $P_{in} = 0$ であるので以下のようにになる。

$$V \cdot dG/dt = F_{in} \cdot G_{in} - F_{out} \cdot G_{out} - \nu_G \cdot (X \cdot V) \quad (6-3)$$

$$V \cdot dP/dt = -F_{out} \cdot P_{out} + \nu_P \cdot (X \cdot V) \quad (6-4)$$

式(6-3)及び式(6-4)を変形すると、

$$V \cdot (\Delta G_n / \Delta t_n) = F_{in} \cdot G_{in} - F_{out} \cdot G_n - \nu_G \cdot (X \cdot V)_n \quad (6-5)$$

$$V \cdot (\Delta P_n / \Delta t_n) = -F_{out} \cdot P_n + \nu_P \cdot (X \cdot V)_n \quad (6-6)$$

となる。これらの式で、下付の n はサンプリング回数を意味している。また、 ν_G は式(5-3)、 ν_P は式(5-7)のモデル式を用いて導出した。連続培養系での $\Delta L / \Delta G$ 比は、回収培養液と新鮮培地中のグルコースと乳酸の濃度から、それぞれの消費、生成速度を算出して求めた。サンプリングは一日一回行ったので Δt_n はほぼ1日に相当する。

総細胞数の $(X \cdot V)_n$ は式(6-5)を変形して、3点の移動平均値から推定した。その際、 $F_{in} = F_{out} = F_n$ とした。その式を式(6-7)に示す。

$$(X \cdot V)_n = \{F_n \cdot (G_{in} - G_n) - V \cdot (G_n - G_{n-2}) / 2\} / \nu_G \quad (6-7)$$

また、rsTM生産速度及び回収培養液中のrsTM濃度の推定値は、式(6-6)に式(6-5)を代入して導出した式(6-8)を用いて計算した。

$$P_n \cdot F_n = F_n \cdot \{P_n + \nu_P \cdot [D \cdot (G_{in} - G_n) - (\Delta G_n) / \nu_G] / (1 + D)\} \quad (6-8)$$

式(6-8)中の D は希釈率(Dilution rate)を表している。

Fig.6-4及びFig.6-5に、実験a、実験bの実験結果と推定結果を示す。Fig.6-4a及びFig.6-5aには、グルコース消費速度[g/day]と $\Delta L / \Delta G$ 比[%]の実験結果、Fig.6-4b及びFig.6-5bには、式(6-7)を用いて推定した総細胞数[10^6 cells]の結果と、式(5-7)のモデル式から算出した比rsTM生産速度[μ g/(10^6 cells·d)]の推定値の結果、Fig.6-4c及びFig.6-5cには、式(6-8)を用いて算出したrsTMの生産速度[mg/day]と回収培養液中濃度[mg/l]の、推定結果と実験結果をそれぞれ示す。本実験系ではマイクロキャリアを含むリアクター部分の体積が極端に小さいため、細胞をサンプリングすることが培養系の挙動に対して外乱になりうる可能性が極めて高い。従って、サンプリングについては培養の上澄み液だけに止め、細胞のサンプリングは行わなかった。

Fig.6-4b及びFig.6-5bの総細胞数の推定値は、Fig.6-4a及びFig.6-5aのグルコース消費速度に依存して増加している。培養初期において細胞の増殖が速く、しだいに増殖が飽和している経時変化は、動物細胞培養の特徴をよく表現している。Fig.6-4a及びFig.6-5aの $\Delta L / \Delta G$ 比の値は、培養を始めてから2～3日の期間で実験a、実験bともに比較的低い値になっている。この期間は細胞密度が低く細胞増殖速度が大きいため、効率的にグルコースが消費されて、乳酸生成が低いことが理由と考えられる。5～15日の期間の $\Delta L / \Delta G$ 比は、どちらの実験においても60%程度で推移している

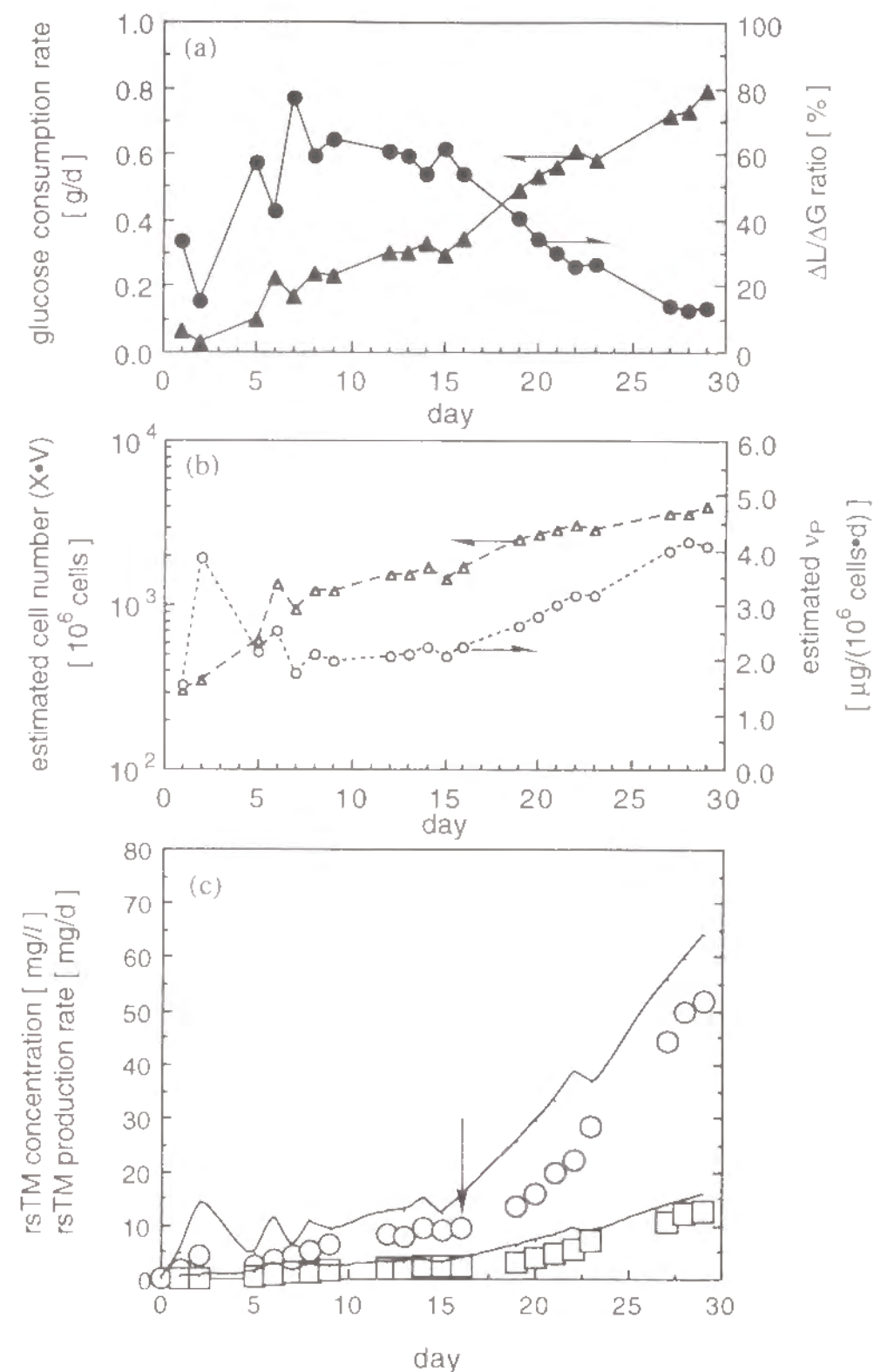


Fig.6-4 実験aの推定結果

- (a) グルコース消費速度 (▲) と $\Delta L / \Delta G$ 比 (●) の実験結果
 (b) 総細胞数 (---Δ---) と比rsTM生産速度 (---○---) の推定結果
 (c) rsTM生産速度の実験結果 (□) と推定結果 (---)
 rsTM濃度の実験結果 (○) と推定結果 (---)
 図中、下向きの矢印は無血清化した日を示す。

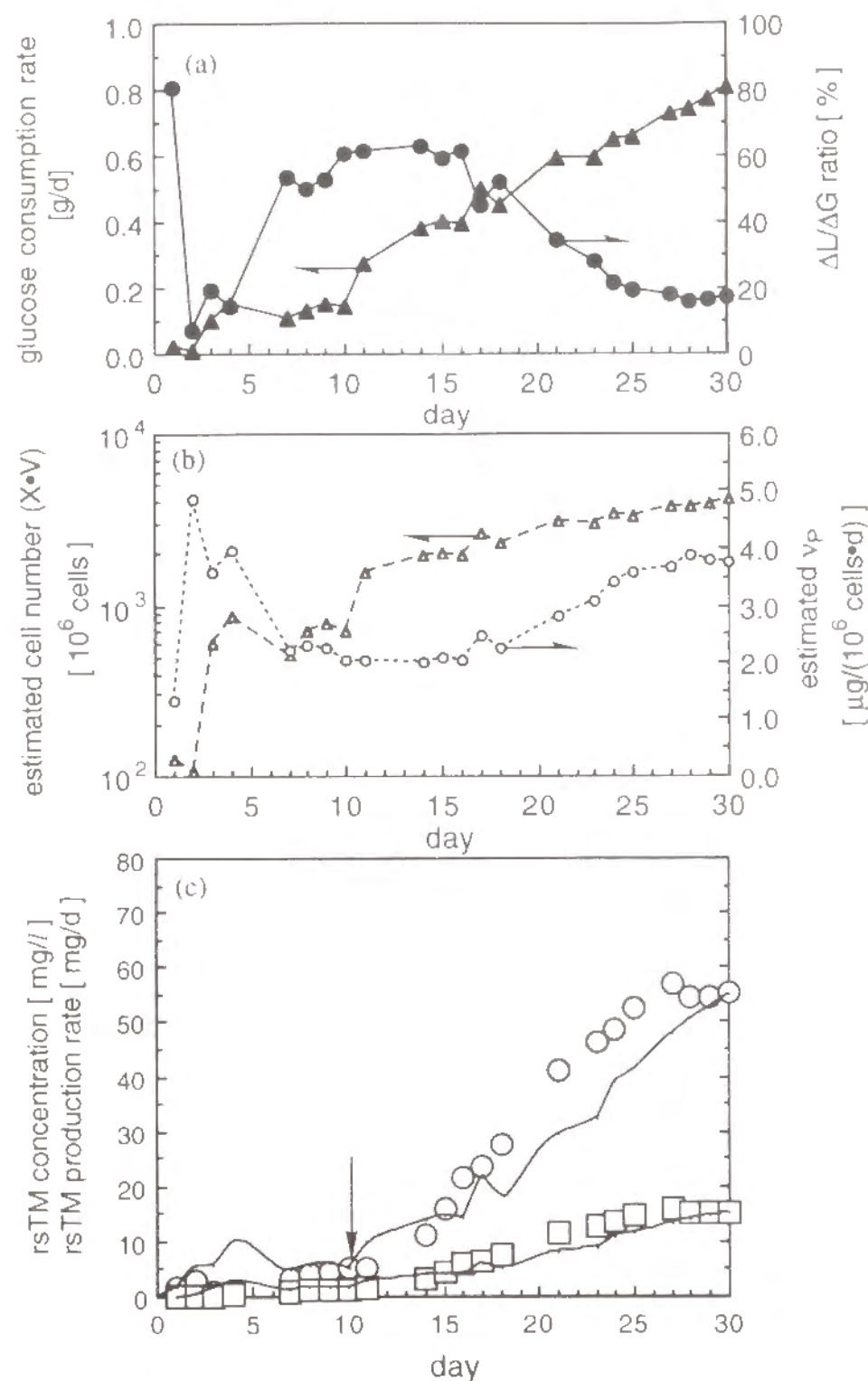


Fig.6-5 実験bの推定結果

- (a) グルコース消費速度 (▲) と $\Delta L/\Delta G$ 比 (●) の実験結果
 (b) 総細胞数 (---Δ---) と比rsTM生産速度 (---○---) の推定結果
 (c) rsTM生産速度の実験結果 (□) と推定結果 (---)
 rsTM濃度の実験結果 (○) と推定結果 (---)
 図中、下向きの矢印は無血清化した日を示す。

が、その後の無血清培養では徐々に下がっている。その結果、Fig.6-4b及びFig.6-5bに示す比rsTM生産速度の推定値は、 $2 \mu\text{g}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{day})$ から $4 \mu\text{g}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{day})$ に上昇している。これらの結果は、繰返し回分培養系での値と同じレベルであり、推定値の妥当性を示している。また、培養初期において1%FBSという極めて低い濃度の血清を用いても、その後に続く無血清培養での比rsTM生産速度には、マイナスの影響がないことを示唆している。Fig.6-4c及びFig.6-5cにおいて、rsTMの生産速度と回収培養液中濃度の実験結果は、実験a、実験bともに初期の血清含有培地での培養では低い値を維持し、無血清培養に入ってから上昇し始めている。推定結果もこの特徴をよく表現できている。Fig.6-4cの実験aでは、実験結果よりも推定値のほうが若干高い値を示しているのに対し、Fig.6-5cの実験bでは、実験結果よりも推定値のほうが低い値を示す傾向にある。しかし、これらの差は小さいため、動物細胞培養系における推定値としては、工業的規模においても充分有用な情報となりうる。また、前半の血清含有下での期間と、無血清培養期間でのrsTM生産性の特徴を充分に反映した結果となっており、繰返し回分培養系で導出したモデル式が連続培養系においても適用可能であり、本推定法が充分実用的であることが証明できた。

6. 3. 3 パラメータ同定による連続培養系の培養特性解析

6. 3. 2で示したように、rsTMの生産速度と回収培養液中濃度の、実験値と推定値の間には僅かではあるが差が認められた。推定値は繰返し回分培養系の実験で導出したモデル式(式(5-3)及び式(5-7))から算出されたものであり、この差は繰返し回分培養系と連続培養系という培養形態の違いや、初期の血清濃度、マイクロキャリアの種類等の培養条件の差から生じている可能性も考えられる。そこで細胞数を推定する式(5-3)と、比rsTM生産速度を推定する式(5-7)のパラメータを種々変更することによってシミュレーションを行い、本モデル式の評価と培養条件の違いによる培養状態への影響について考察を加えた。

実験aに対するシミュレーション結果をFig.6-6に示す。繰返し回分培養系では、式(5-3)中の比グルコース消費速度の値は $0.2 \text{ mg}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{day})$ であったが、この値をパラメータとして種々のシミュレーションを行った結果、Fig.6-6aに示すように $0.26 \text{ mg}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{day})$ の値で推定値と実験値が最もよく一致した。この結果は、繰返し回分培養系と連続培養系では、比グルコース消費速度の値が変化したことを示唆しており、単位当りの細胞が繰返し回分培養よりも多くのグルコースを消費していたことになる。もし、この考察が正しいければ、 $0.2 \text{ mg}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{day})$ で推定した結果は、実際の細胞数よりも高めに推定していたことになり、その結果Fig.6-4cで示したように、推定値の

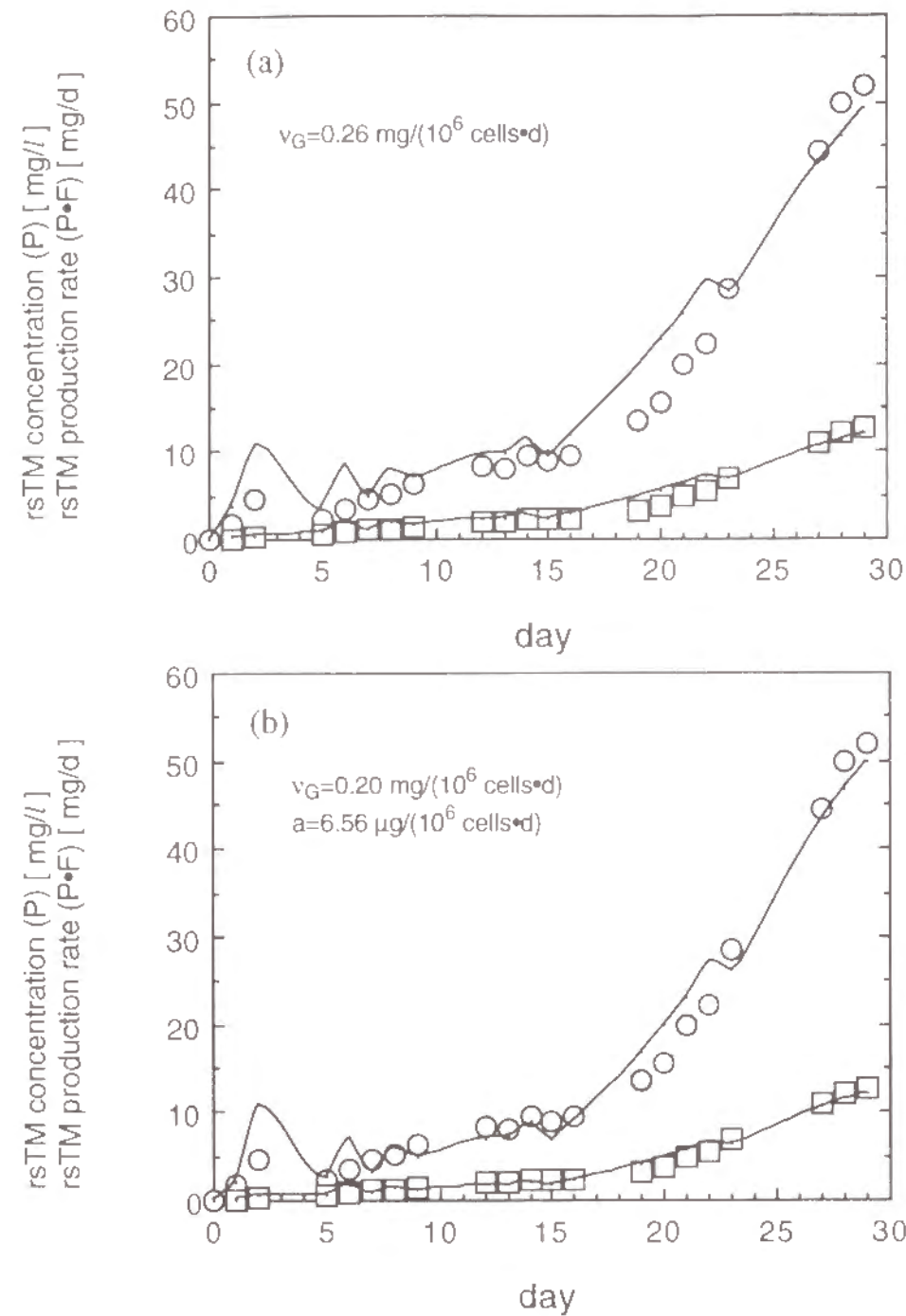


Fig.6-6 パラメータフィッティングによる推定結果 (実験 a)

- (a) 比グルコース消費速度を $0.26 \text{ mg}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})$ とした場合の推定結果
 rsTM生産速度の実験結果 (□) と推定結果 (—)
 rsTM濃度の実験結果 (○) と推定結果 (—)
 (b) 比rsTM生産速度を表すモデル式のパラメータ "a" を 6.56 とした場合の推定結果
 rsTM生産速度の実験結果 (□) と推定結果 (—)
 rsTM濃度の実験結果 (○) と推定結果 (—)

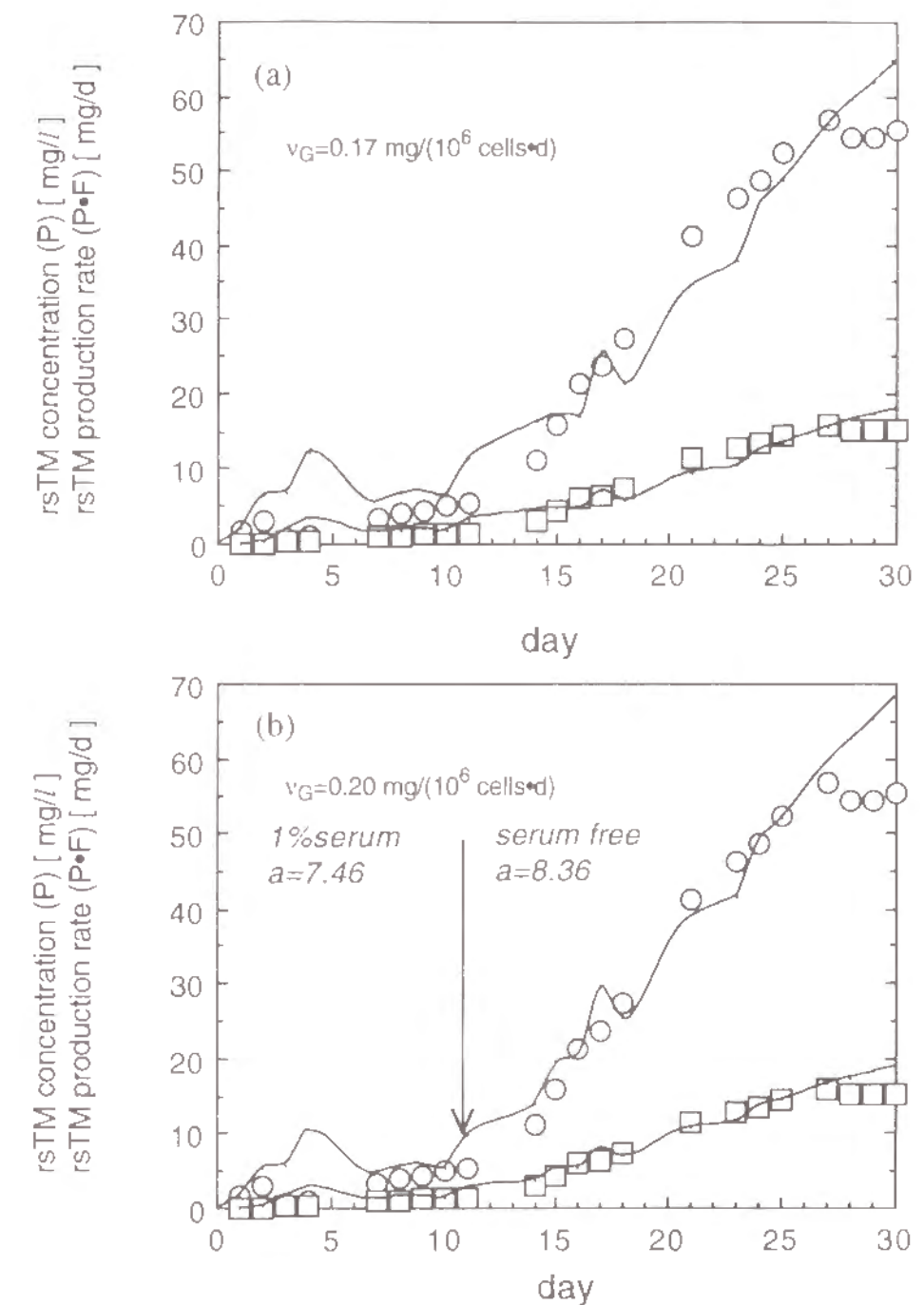


Fig.6-7 パラメータフィッティングによる推定結果 (実験 b)

- (a) 比グルコース消費速度を $0.17 \text{ mg}/(10^6 \text{ cells} \cdot \text{d})$ とした場合の推定結果
 rsTM生産速度の実験結果 (□) と推定結果 (—)
 rsTM濃度の実験結果 (○) と推定結果 (—)
 (b) 比rsTM生産速度を表すモデル式のパラメータ "a" を 8.36 とした場合の推定結果
 rsTM生産速度の実験結果 (□) と推定結果 (—)
 rsTM濃度の実験結果 (○) と推定結果 (—)

方が実験値よりも高めになったことになる。一方、比グルコース消費速度の値を $0.2\text{mg}/(10^6\text{cells}\cdot\text{day})$ に固定して、式(5-7)中の定数である“a”をパラメータとして種々のシミュレーションを行った。式(5-7)中のパラメータ“a”はおおよそ比rsTM生産速度の最大値を表しており、この値を変化させることによってシミュレーション結果も大きく変動した。Fig.6-6bに示すように、“a”が $6.56\mu\text{g}/(10^6\text{cells}\cdot\text{day})$ の際に推定値と実験値が最もよく一致した。繰返し回分培養系の“a”の値は $7.46\mu\text{g}/(10^6\text{cells}\cdot\text{day})$ であったので、実験aでは比rsTM生産速度の値が小さくなったことを示唆している。この考察によると、 $7.46\mu\text{g}/(10^6\text{cells}\cdot\text{day})$ で推定した結果は、実際のrsTM生産速度よりも高めに推定していたことになり、上記と同様にFig.6-4cで推定値の方が実験値よりも高めになった原因である可能性がある。

実験bに対するシミュレーション結果をFig.6-7に示す。実験aと同様に、式(5-3)中の比グルコース消費速度の値(Fig.6-7a)と、式(5-7)中の定数である“a”の値(Fig.6-7b)をパラメータとして種々のシミュレーションを行った。Fig.6-7aに示すように、比グルコース消費速度の値を $0.17\text{mg}/(10^6\text{cells}\cdot\text{day})$ にした結果が最もよく一致した。実験aでは比グルコース消費速度の値が大きくなったことが示唆されたが、実験bでは逆の結果になった。この考察によると $0.2\text{mg}/(10^6\text{cells}\cdot\text{day})$ で推定した結果は、実際の細胞数よりも低めに推定していたことになり、その結果Fig.6-5cで示したように推定値の方が実験値よりも低めになったことになる。一方、比グルコース消費速度の値を $0.2\text{mg}/(10^6\text{cells}\cdot\text{day})$ に固定して、式(5-7)中の“a”をパラメータとして種々のシミュレーションを行った結果、Fig.6-7bに示すように、 $8.36\mu\text{g}/(10^6\text{cells}\cdot\text{day})$ の際に推定値と実験値が最もよく一致した。この結果は、実験bでは比rsTM生産速度の値が大きくなったことを示唆している。従って、 $7.46\mu\text{g}/(10^6\text{cells}\cdot\text{day})$ で推定した結果は、実際のrsTM生産速度よりも低めに推定していたことになり、Fig.6-5cで推定値の方が実験値よりも低めになったことが説明できる。

以上の考察により、培養条件の違いによって培養状態に多少の変化が生じたことが推察される。細胞数を測定しなくても、種々のパラメータを変えてフィッティングを行うことによって、どのような状態変化がどの程度生じていたのかを定量的に把握できた。このようなパラメータ同定の手法によって培養状態が把握でき、さらに、細胞数が測定可能になれば、培養を行う際の対策が容易になることが期待できる。

本章では、CHO(21)を流動層型の連続培養系に適用し、培養特性の解析を行った。また、5章で繰返し回分培養系の実験データに基づいて導出したモデル式を、連続培養系に拡張して適用した。その結果、以下に示すような結果が得られた。

- ①：培養初期に用いる血清濃度の低減によって、血清の使用量を大幅に削減した。
- ②：無血清化することによってrsTM生産速度が増大した理由は、CHO(21)のグルコースの代謝特性が変化したためであることを見いだした。
- ③：繰返し回分培養系で導出したモデル式を用いて、連続培養系のrsTM生産速度の推定が可能であることを示した。
- ④：モデル式のパラメータを変えてシミュレーションを行うことによって、繰返し回分培養系と連続培養系の培養状態の相違について定量的に考察できた。

繰返し回分培養系での培養状態は非定常系であり、常に培養状態変数が大きく変動しているのに対し、連続系では一応定常系は維持されているものと認識されている。確かに細胞密度、グルコース濃度、乳酸濃度、タンパク質濃度等は振動はするものの、回分培養系ほど変動が大きい状態は維持可能である。しかし動物細胞培養では連続系とはいっても、化学プラントに見られるような定常系は達成困難であり、細胞の生物学的なミクロの状態は常に変動しつつある。繰返し回分培養系で導出したモデル式が連続培養系に適用してきた最大の理由は、培養形態にかかわらず培養環境の良否が同一レベルであり、細胞内部の状態もそれほどかけ離れていなかったためと考えている。従って、生物学的なモデリングを行うときに重要なのは表面的な状態ではなく、細胞内部の状態まで立ち入った解析が重要であることを裏付けている。即ち、表面的な状態変数に依存したモデル式は拡張性に限界が生じることになるが、本研究で示したように、ある程度細胞内部の生化学的な状態を表現しているモデル式ならば、培養形態を超えた拡張性が期待できる。

流動層型バイオリアクターやホローファイバー型バイオリアクターにおいて細胞数の推定が可能になれば、培養状態を把握する場合や生理活性物質の生産性に影響を与える要因を解析する上で、非常に有効な手段となる。本章では、5章のモデル式のままでは完璧とまではいえないが、流動層型バイオリアクターにおいて充分実用的であることが証明できた点で意義は大きい。将来的にも、モデリング困難な培養系が多々考案されるものと思われる。その様な場合のモデル式構築の方法として、本研究で採用したような生化学的なパラメータを利用して、簡単な培養系でモデリングを行うことの有効性が見いだされるものと考えている。

第6章の記号表

| | |
|-----------------------|--|
| a | : 式(5-4)のパラメータ |
| D | : 希釈率 [1/d] |
| F_{in} | : 培地供給速度 [l/day] |
| F_n | : n サイクル目の培地供給・回収速度 [l/day] |
| F_{out} | : 培養液回収速度 [l/day] |
| G | : 培養液中グルコース濃度 [g/l] |
| G_{in} | : 流入培地中グルコース濃度 [g/l] |
| G_n | : n サイクル目の培養液中グルコース濃度 [g/l] |
| G_{out} | : 回収培養液中グルコース濃度 [g/l] |
| n | : サンプル回数 |
| L | : 培養液中乳酸濃度 [g/l] |
| P | : 培養液中rsTM濃度 [mg/l] |
| P_{in} | : 流入培地中rsTM濃度 [mg/l] |
| P_n | : n サイクル目の培養液中rsTM濃度 [mg/l] |
| P_{out} | : 回収培養液中rsTM濃度 [mg/l] |
| t | : 時間 [day] |
| t_n | : n サイクル目の時間 [day] |
| V | : リサイクル部位を含むVerax system 1のリアクター体積 [l] |
| X | : 細胞密度 [10^6 cells/ml] |
| $(X \cdot V)$ | : 総細胞数 [10^6 cells] |
| $\Delta L / \Delta G$ | : 乳酸生成量／グルコース消費量 [%] |
| ν_G | : 比グルコース消費速度 [mg/(10^6 cells·day)] |
| ν_p | : 比rsTM生産速度 [μ g/(10^6 cells·day)] |

第7章 総括

7. 1 本論文の要約

動物細胞培養を利用した有用物質生産の研究は、昨今目ざましいものがある。特に、商業レベルでは培地や培養装置の開発がかなり進んでいる。しかし、それらの材料を使用すれば、即、希望通りの結果が得られるわけでない。同じ培地や装置を用いても、培養方法によって結果は大きく異なるところが動物細胞培養の難しさである。適切な培養方法を見つけ出すためには、細胞の特性を初めとして、細胞増殖、有用物質生産、培養状態に関する特性を的確に把握しなければならない。分子生物学的、生化学的現象論はかなりわかってきているものの、それらの現象を工学的レベルで把握し定量化することは、まだ難しいと言わざるをえない。培養状態としてのマクロな現象と、分子生物学的、生化学的ミクロな現象の接点、因果関係がブラックボックスであり、捕らえきれていないことが原因である。本論文では、医薬品生産において経済的、かつ再現性のある生産方法を確立するために、化学工学的手法の特徴である生物反応速度論的アプローチを利用することによって、生化学的現象を工学的レベルまで定量化して解析を行い、工学的応用展開を試みた。

第2章では、形質転換CHO-K1細胞(CHO(21))を用いて、培地組成やマイクロキャリア濃度などの基礎的な培養条件を検討することによって、種々の有益な結論を得た。培地中グルコース濃度が到達細胞密度に影響していること、培地中血清濃度が低いと、細胞増殖速度や到達細胞密度、及び有用物質生産性が血清濃度に依存して下がること、無血清培地の種類によって有用物質生産性が大きく異なること、ITESの添加によって有用物質生産性が飛躍的に上がることを明らかにした。この成果として高価な血清使用量の削減を可能にし、かつ無血清化培養を確立することによって、ダウンストリームとしての精製工程の負荷を縮小することができた。また、マイクロキャリア濃度と細胞増殖特性の関係を解析することによって、マイクロキャリア濃度が1g/l～6g/lの範囲では、細胞の増殖性に有意差がないことを明らかにした。その結果、マイクロキャリアの最適使用量(1g/l)を決定し、血清と同様に高価なマイクロキャリアの使用量の削減によって、経済的な生産を達成した。これらの基礎的項目の成果は、工業的生産での最適化を目指す場合や、スケールアップで良好な結果を得るための土台として、充分にその条件を備えた結果であった。

第3章では、スケールアップを指向したミニジャーファーメンター培養において、生物反応速度を用いて解析し、生化学的現象を工学的レベルで考察を行った。その結果、生理活性物質の生産性を高めるためには、溶存酸素、グルコース濃度、培養液回収間隔が重要な操作変数であり、それらの結果であるグルコースの乳酸への転化率 ($\Delta L / \Delta G$) が重要な状態変数であることを明らかにした。さらに、それらの操作変数を適切に設定し、 $\Delta L / \Delta G$ を低く維持する方策を確立した。その結果、培養液体積当りのrsTM生産速度の最大値を導くことができた。それほど特殊な培養装置を用いたわけではないにもかかわらず、初期細胞増殖期間の短期化 (5日)、血清濃度の低減 (5%)、無血清培地による培養、さらに培養液回収サイクル期間の延長 (3日間) による無血清培地使用量の低減、マイクロキャリア使用量の削減 (1g/l)、純酸素通気による酸素使用量の低減 (0.1l/min)、など種々の省コスト化戦略を十分に満足した条件下で、極めて高い生理活性物質生産速度と培養の長期化という好結果を得ることができた。従来からブラックボックスであった生化学的現象と培養状態との因果関係を見つけ出し、適切な培養条件の設定を行った成果である。

第4章では、グリコサミノグリカン側鎖が付加しているトロンボモジュリン (rsTM β 体) の培養生産の特性を解析し、選択的にrsTM β 体を高生産する方策を明らかにした。rsTM α 体及びrsTM β 体の発現に及ぼす溶存酸素の影響を考察し、高い酸素供給下で選択的にrsTM β 体が高生産されることを見いだした。さらに $\Delta L / \Delta G$ 比を指標とし、この値を低くするような培養条件によって、rsTM β 体の生産性を増大することができることを明らかにした。これらの培養条件によって、総rsTMの生産性とrsTM β の生産性の両方を矛盾なく高める方策が確立できた。以上、本章では、タンパク質だけではなく糖鎖をも考慮して培養工学的に糖タンパク質の生産方法を検討し、糖鎖を付加したタンパク質の生産性を選択的にコントロールする方策を明らかにすることができた。

第5章では、測定結果を得るためのタイムラグが長い細胞数やタンパク質量に関して、オンラインでそれらの状態量を把握する方法論を提唱することができた。繰返し回分培養系の実験データから、細胞数とグルコース消費速度の相関関係、並びにrsTM生産速度と $\Delta L / \Delta G$ 比の相関関係を見いだすことによって、比グルコース消費速度及び比rsTM生産速度を表す反応速度式を導出した。そして、これらの反応速度式を利用して、細胞数、生理活性物質の生産量を推定する方法を開発した。

推定アルゴリズムは、

- ①：グルコース消費速度から、細胞密度
- ②：細胞密度と比rsTM生産速度の推定値から、rsTMの生産速度と培養液中濃度
- ③：総rsTM生産速度から、rsTM β 体とrsTM α 体の生産速度

を推定する部分によって構成された。この推定法によって、培養初期に用いた培地中血清濃度の値にかかわらず、細胞数や発現タンパク質濃度などの培養状態量が推定可能であることを示し、繰返し回分培養系において充分実用的であることを実証した。

第6章では、CHO(21)を連続培養系に適用した。培養初期に用いる血清濃度のさらなる低減に成功し、無血清培養条件下においてrsTMの高生産性を達成した。CHO(21)培養の特性解析を行った結果、無血清化後にrsTM生産速度が増大するのは、細胞内部の代謝特性が変化したためであることを見いだした。また、第5章で開発した推定法を、無血清連続培養へ適用した。連続回収培養液内のrsTM濃度の推定結果を示し、繰返し回分培養系の実験データを基に導出したモデル式が、連続系流動層型バイオリアクターにおいても充分実用性があることを明らかにした。さらに、モデル式のパラメータを変えてシミュレーションを行うことによって、繰返し回分培養系と流動層型連続培養系の培養状態の相違を、定量的に把握できることを明らかにした。

7. 2 今後の展望

分子生物学的手法を用いてさまざまな有用タンパク質が創製されつつあるが、今後は、それらの物質が細胞内部の生化学的な挙動に対して、どのような作用機構で関与しているのかがしだいに明らかにされていくものと思われる。

本研究では、培養の初期に血清含有培地を用いた後に無血清培養を成功させたが、血清組成中の全ての成分が同定され、かつ細胞に対する作用機構が解明されれば、あらゆる種類の細胞について完全無血清培養も実現可能になる。細胞培養をより最適なものに近付けるためには、細胞内部の生化学的現象に立ち入って解析することが不可欠であり、本研究で用いたような方法論は、益々発展していくであろう。しかし、今後は生化学的解析からさらに一步進んだレベルで、DNAやRNAを含めた分子生物学的解析に基づいた培養現象のモデリングも、実現される日がくるものと考えている。その際には、動物細胞培養の積極的な制御方法の開発や、細胞の性質そのものを工学的に制御することも期待できる。本研究では糖タンパク質の選択的生産性について言及したが、現段階では緒についたばかりである。生化学的解析と工学的な方法論の融合がさらに進めば、糖タンパク質の選択的生産性を工学的に精度良く制御することや、糖構造を構成する糖組成についても工学的にアプローチすることが可能になるであろう。本研究では、バイオリアクターや細胞固定化担体などのハード面の開発については対象とはしなかったが、それらについても益々発展していくものと思われる。ハード面と、先に述べたソフト面の技術的進歩がお互いに補完しあうことによって、動物細胞の培養技術は益々発展していくであろうし、また、これらの技術の進歩にともなって細胞培養技術の応用範囲や適用方法、利用価値が拡大していくことを期待している。

引用文献

- 1) Morishita K. and Maeda S : J. Biotechnol. 20, 223-234 (1991)
- 2) Higashihashi N., Arai Y., Enjo T., Horiuchi T., Saeki Y., Sakano K., Sato Y., Takeda K., Takashina S. and Takahashi T : J. Virolog. Methods 35, 159-167 (1991)
- 3) Maeda S., Kawai T., Obinata M., Fujiwara H., Saeki Y., Sato Y. and Furusawa M. : Nature 315, 592-594 (1985)
- 4) Urlaub G. and Chasin L. A. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 4216-4220 (1980)
- 5) Kaufman R. J. and Sharp P. A. : J. Mol. Biol. 159, 601-621 (1982)
- 6) McCormick F., Trahey M., Innis M., Dieckmann B. and Ringold G. : Mol. Cell. Biol. 4, 166-172 (1984)
- 7) Kaufman R. J., Wasley L. C., Spiliotes A. J., Gossels S. D., Latt S. A., Larsen G. R. and Key R. M. : Mol. Cell. Biol. 5, 1750-1759 (1985)
- 8) Haynes J. and Weissmann C. : Nucleic Acids Res. 11, 687-706 (1983)
- 9) Scahill S. J., Devos R., Heyden J. V. and Fiers W. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 80, 4654-4658 (1983)
- 10) Sonoda H., Mori H., Kikutani H., Nishitani Y., Hirono M., Taniguchi T. and Watanabe S. : J. Biotechnol. 9, 61-70 (1988)
- 11) Murata M., Onomichi K., Eto Y., Shibai H. and Muramatsu M. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 151, 230-235 (1988)
- 12) Hata J., Yamashita S., Yagihashi S., Kato H., Kabeno S., Hirai K., Kuma K., Kimura S., Umeki K., Kotani T. and Ohtaki S. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 164, 1268-1273 (1989)
- 13) Imai N., Kawamura A., Higuchi M., Oh-cda M., Orita T., Kawaguchi T. and Ochi N. : J. Biochem. 107, 352-359 (1990)
- 14) Sasaki H., Bothner B., Dell A. and Fukuda M. : J. Biol. Chem. 262,

12059-12076 (1987)

- 15) Takeuchi M., Takasaki S., Shimada M. and Kobata A. : J. Biol. Chem. 265, 12127-12130 (1990)
- 16) Hokke C. H., Bergwerff A. A., Dedem G. W. K., Oostrum J., Kamerling J. P. and Vliegenthart J. F. G. : FEBS Lett. 275, 9-14 (1990)
- 17) Barnes D. and Sato G. : Anal. Biochem. 102, 255-270 (1980)
- 18) Maurer H. R. : In "Animal Cell Culture", Freshney R. I. ed., 13-31 (1986)
- 19) Griffiths J. B. : Dev. Biol. Stand. 66, 155-160 (1987)
- 20) Reuveny S. and Thoma R. W. : Adv. Appl. Microbiol. 31, 139-179 (1986)
- 21) Croughan M. S., Hamel J. P. and Wang D. I. C. : Biotechnol. Bioeng. 32, 975-982 (1988)
- 22) Tao T., Ji G. and Hu W. : Biotechnol. Bioeng. 32, 1037-1052 (1988)
- 23) Vorlop J. and Lehmann J. : Chem. Eng. Technol. 11, 171 (1988)
- 24) Spier R. E. and Whiteside J. P. : Dev. Biol. Stand. 55, 151-152 (1984)
- 25) Shirai Y., Hashimoto K., Yamaji H. and Kawahara H. : Appl. Microbiol. Biotechnol. 29, 113-118 (1988)
- 26) Mizutani S., Iijima S., Morikawa M., Shimizu K., Matsubara M., Ogawa Y., Izumi R., Matsumoto K. and Kobayashi T. : J. Ferment. Technol. 65, 325-331 (1987)
- 27) Shimizu K., Morikawa M., Mizutani S., Iijima S., Matsubara M. and Kobayashi T. : J. Chem. Eng. 21, 113-117 (1988)
- 28) Hayter P. M., Curling E. M. A., Baines A. J., Jenkins N., Salmon I., Strange P. G., Tong J. M. and Bull A. T. : Biotechnol. Bioeng. 39, 327-335 (1992)
- 29) Sugiura T. : Biotechnol. Bioeng. 39, 953-959 (1992)
- 30) Omasa T., Higashiyama K., Shioya S. and Suga, K. : Biotechnol. Bioeng. 39, 556-564 (1992)
- 31) 高松武一郎、塩谷捨明：発酵と工業 45, 2-11 (1987)
- 32) Shimizu H., Takamatsu T., Shioya S. and Suga K. : Biotechnol. Bioeng. 33, 354-364 (1989)
- 33) Miller W. M., Wilke C. R. and Blanch H. W. : Biotechnol. Bioeng. 33, 477-486 (1989)
- 34) Miller W. M., Wilke C. R. and Blanch H. W. : Biotechnol. Bioeng. 33, 487-499 (1989)
- 35) Fleischaker R. J., Weaver J. C. and Sinskey A. J. : Adv. Appl. Microbiol. 27, 137-167 (1981)
- 36) Miller W. M., Blanch H. W. and Wilke C. R. : Biotechnol. Bioeng. 32, 947-965 (1988)
- 37) Shirai Y., Hashimoto K. and Takamatsu H. : J. Ferment. Bioeng. 73, 159-165 (1992)
- 38) Glacken M. W., Adema E. and Sinskey, A. J. : Biotechnol. Bioeng. 32, 491-506 (1988)
- 39) Bree M. A., Dhurjati P., Geoghegan R. F. and Robnett B. : Biotechnol. Bioeng. 32, 1067-1072 (1988)
- 40) 小林茂保：BIO INDUSTRY 4, 182-750 (1987)
- 41) Murata M., Eto Y. and Shibai H. : J. Ferment. Technol. 66, 501-507 (1988)
- 42) Tsuji T., Eto Y., Takano S., Takezawa M., Yokogawa Y. and Shibai H. : Biotechnol. Bioeng. 31, 675-681 (1988)
- 43) 小山直人、柴井博四郎：組織培養 15, 278-282 (1989)
- 44) Griffiths B. : In "Animal Cell Culture", Freshney R. I. ed., 33-69 (1986)
- 45) Glacken M.W., Fleischaker R.J. and Sinskey, A.J. : Ann. N. Y. Acad. Sci.

- 413, 355-372 (1983)
- 46) Bliem R. and Katinger H. : Trends Biotechnol. 6, 190-195 (1988)
 - 47) Bliem R. and Katinger H. : Trends Biotechnol. 6, 224-230 (1988)
 - 48) Feder J. and Tolbert W. R. : Scientific America 248, 24-31 (1983)
 - 49) Griffiths J. B., Cameron D. R. and Looby D. : Dev. Biol. Stand. 66, 331-338 (1987)
 - 50) Avgerinos G. C., Drapeau D., Socolow J. S., Mao J., Hsiao K. and Brocze R. J. : Bio/Technol. 8, 54-58 (1990)
 - 51) Runstadler P. W. and Cernek S. R. : In "Animal Cell Biotechnology", Spier R. E. and Griffiths B. ed., 306-320 (1988)
 - 52) Butler M., Imamura T., Thomas J. and Thilly W. G. : J. Cell Sci. 61, 351-363 (1983)
 - 53) Tolbert W. R., Lewis C. Jr., White P. J. and Feder J. : In "Large-Scale Mammalian Cell Culture", Feder J. and Tolbert R. W. eds., 97-123 (1985)
 - 54) 渡嘉敷通之 : 組織培養 15, 283-287 (1989)
 - 55) 佐藤征二 : "動物細胞大量培養と有用物質生産"、大石道夫監修、83-98 (1986)、シーエムシー
 - 56) Esmon N. L. : In "Progress in Haemostasis and Thrombosis", Coller B. S. ed., 29-55 (1988)
 - 57) Esmon C. T. : J. Biol. Chem. 264, 4743-4746 (1989)
 - 58) Jackman R. W., Beeler D. L., Fritze L., Soff G. and Rosenberg R. D. : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 6425-6429 (1987)
 - 59) Suzuki K., Kusumoto H., Deyashiki Y., Nishioka J., Maruyama I., Zushi M., Kawahara S., Honda G., Yamamoto S. and Horiguchi S : EMBO J. 6, 1891-1897 (1987)
 - 60) Wen D., Dittman W. A., Ye R. D., Deaven L. L., Majerus P. W. and

- Sadler J. E. : Biochemistry 26, 4350-4357 (1987)
- 61) Stearns D. J., Kurosawa S. and Esmon C. T. : J. Biol. Chem. 264, 3352-3356 (1989)
 - 62) Kurosawa S., Stearns D. J., Jackson K. W. and Esmon C. T. : J. Biol. Chem. 263, 5993-5996 (1988)
 - 63) Parkinson J. F., Grinnell B. W., Moore R. E., Hoskins J., Vlahos C. J. and Bang N. U. : J. Biol. Chem. 265, 12602-12610 (1990)
 - 64) Nawa K., Sakano K., Fujiwara H., Sato Y., Sugiyama N., Teruuchi T., Iwamoto M. and Marumoto Y. : Biochem. Biophys. Res. Commun. 171, 729-737 (1990)
 - 65) Nawa K., Itani T., Ono M., Sakano K., Marumoto Y. and Iwamoto M. : Thrombosis and Haemostasis 67, 366-370 (1992)
 - 66) 木幡陽 : "タンパク質への糖鎖付加に関する諸問題"、105-116
 - 67) Tsuda E., Goto M., Murakami A., Akai K., Ueda M., Kawanishi G., Takahashi N., Sasaki R., Chiba H., Ishihara H., Mori M., Tejima S., Endo S. and Arata Y. : Biochemistry 27, 5646-5654 (1988)
 - 68) Ruoslahti E. : J. Biol. Chem. 264, 13369-13372 (1989)
 - 69) Imai N., Kawamura A., Higuchi M., Oh-eda M., Orita T., Kawaguchi T. and Ochi N. : J. Biochem. 107, 352-359 (1990)
 - 70) Katinger H. : Dev. Biol. Stand. 66, 195-209 (1987)
 - 71) 合葉修一、A.ハンフリー、N.ミリス : "生物化学工学"、東京大学出版会 (1981)
 - 72) Yamaguchi Y. and Ruoslahti E. : Nature 336, 244-246 (1988)
 - 73) Koyama T., Parkinson J. F., Aoki N., Bang N. U., Muller-Berghaus G. and Preissner K. T. : Brit. J. Haematol. 78, 515-522 (1991)
 - 74) 坂野ら : 第一製薬社内研究報告 (1990)
 - 75) Sano E., Sudo T., Okano K., Sawada R., Ito M., Naruto M., Iizuka M.

- and Kobayashi S. : In "Biotechnology of Mammalian Cells", Umeda M. et al. eds., 149-162 (1987)
- 76) 岸本通雅、吉田敏臣：醗酵工学会誌 69, 107-116 (1991)
- 77) Shi Z. and Shimizu K. : J. Ferment. Bioeng. 74, 39-45 (1992)
- 78) 橋本健治：“反応工学”、培風館 (1993) 改訂第2刷
- 79) Kilburn D. G., Fitzpatrick P., Blake-Coleman B. C., Clarke D. J. and Griffiths J. B. : Biotechnol. Bioeng. 33, 1379-1384 (1989)
- 80) Watson J. D., Hopkins N. H., Roberts J. W., Steitz J. A. and Weiner A. M. : In "Molecular Biology of the Gene", (1987)
- 81) Alberts B., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K. and Watson J. D. : In "Molecular Biology of the Cell", (1983)
- 82) Frame K. F. and Hu W. : Biotechnol. Bioeng. 32, 1061-1066 (1988)
- 83) Cherry R. S. and Papoutsakis E. T. : Biotechnol. Bioeng. 33, 300-305 (1989)
- 84) Leno M., Merten O. and Hache J. : Biotechnol. Bioeng. 39, 596-606 (1992)
- 85) Shirai Y., Hashimoto K., Yamaji H. and Tokashiki M. : Appl. Microbiol. Biotechnol. 26, 495-499 (1987)
- 86) カッティンガー H., リューカー F.：“遺伝：別冊1号” 63-71 (1988)
- 87) 丹羽国守：応用細胞生物学研究 6, 27-32 (1988)
- 88) Belfort G. : Biotechnol. Bioeng. 33, 1047-1066 (1989)

1. Ogata M., Wakita K., Kimura K., Marumoto Y., Oh-i K. and Shimizu S. High-level expression of recombinant human soluble thrombomodulin in serum-free medium by CHO-K1 cell. Appl. Microbiol. Biotechnol., 38, 520-525 (1993)
2. Ogata M., Wakita K., Sakano K., Kimura K., Marumoto Y., Oh-i K. and Shimizu S. Characteristics of CHO-K1 cell culture producing two types of recombinant soluble thrombomodulin. J. Ferment. Bioeng., 75, 293-298 (1993)
3. Ogata M., Marumoto Y., Oh-i K., Shimizu S. and Katoh S. Estimation of cell density and protein production from glucose and lactate measurement. Proceeding of APCCHE & CHEMECA 93, Australia, Vol. 2, 427-432 (1993)
4. Ogata M., Marumoto Y., Oh-i K., Shimizu S. and Katoh S. Continuous culture of CHO-K1 cells producing thrombomodulin and estimation of culture conditions. J. Ferment. Bioeng., 77, p46-p51 (1994)

謝 辞

本論文を作成するにあたり、多大な激励を賜り、ご指導とご鞭撻を賜りました京都大学工学部 橋本健治教授、同 橋本伊織教授、同 田中渥夫教授に心から御礼申し上げます。また、本論文の内見審査並びに格別なご指導を賜りました京都大学工学部 加藤滋雄助教授に心より御礼申し上げます。

著者が京都大学大学院工学研究科時代にご指導賜りました京都大学名誉教授 現関西大学工学部教授 高松武一郎先生、現大阪大学工学部 塩谷捨明教授、現宮崎大学工学部 大嶋正裕助教授に心から感謝申し上げます。

社外留学の際にお世話になり、ご指導を賜りました東洋紡績株式会社 医薬研究所所長 西村勝博士、清水伸博士、大井清源博士、清水範英博士、並びに医薬研究所の方々に心から御礼申し上げます。

本研究の機会をお与え下さり、ご指導、ご鞭撻を賜りました埼玉第一製薬株式会社 湯川弘会長、第一化学薬品株式会社 國吉家治社長、同 常務取締役 平山忠允博士、第一製薬株式会社 常務取締役 諏訪要博士、同 理事 技術部長 嶋田定勝博士、同 静岡工場長 黒田宏紀博士に謹んで感謝申し上げます。

本研究の機会と学位取得の機会をお与え下さり、激励とご支援を賜りました第一製薬株式会社 生産技術研究所 藤原敏洋所長、武田勉副所長、木村一夫主任技師、宮寺彰彦主任技師、並びに生産技術研究所の方々に深く感謝申し上げます。

本研究の機会をお与え下さり、直接のご指導を賜りました第一製薬株式会社 特別参与 分子生物研究室室長 古澤満博士には謹んで感謝申し上げます。また、研究遂行にあたりご指導とご助言、ご協力を賜りました同社探索第二研究所の丸本恭正博士、村上賢二博士、同社分子生物研究室内の佐藤嘉生博士、堀内正博士、坂野勝一博士、杉山則文研究員、デボラスターンズ黒沢博士、脇田賢一室員、山下京子元社員には心より感謝申し上げます。

最後に、学位取得にあたり、あらゆる面で支えてくれた妻 隆子に心から感謝致します。